

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна

Національної академії наук України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

**СІРОМОЛОТ АНДРІЙ АНДРІЙОВИЧ**

УДК 616-002.5+577.112+579.62

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ІМУНОБІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АНТИГЕНІВ *Mycobacterium*  
*SPP.* MPT63 І MPT83 ТА ЇХ РОЛЬ У ДІАГНОСТИЦІ ТУБЕРКУЛЬОЗУ**

03.00.09 – імунологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Сіромолот А.А.

Науковий керівник: Колибо Денис Володимирович, доктор біологічних наук,  
професор

Київ – 2018

## АНОТАЦІЯ

*Сіромолот А.А.* Імунобіологічні властивості антигенів *Mycobacterium spp.* МРТ63 і 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.

Мікобактеріози (включно з туберкульозом) – поширені інфекційні захворювання людини і тварин. Туберкульоз досі залишається головною причиною смертності в країнах, що розвиваються. Окрім того, захворювання на туберкульоз призводить до значних щорічних економічних збитків у аграрних країнах, через ураження великої рогатої худоби (ВРХ).

Знання стосовно механізмів патогенезу та розвитку мікобактеріальної інфекції постійно оновлюються, а виникнення штамів з мультирезистентністю до ліків сприяє пошуку нових ефективних терапевтичних засобів. Взаємодії бактеріальних патогенних чинників з молекулами-мішенями призводять до прояву специфічних ефектів у клітинах господаря. Таким чином, вивчення особливостей і функцій мікобактеріальних антигенів є обов'язковою умовою для профілактики та лікування туберкульозу.

Визначення клітинних і молекулярних мішеней для імунодомінантних антигенів *Mycobacterium tuberculosis complex* (група близькоспоріднених штамів, що характеризуються високим ступенем гомології та ідентичністю 16S рРНК) МРТ63 та МРТ83 може бути корисним для розуміння механізмів патогенезу мікобактеріальної інфекції. Залишається відкритим питання, як антигени *M.tuberculosis*, у тому числі МРТ63 і МРТ83, беруть участь в захопленні мікобактерій макрофагами та уникненні лізису бактерій у ендосомах. Тому вивчення ролі протеїнів *M.tuberculosis* МРТ63 і МРТ83 у

перебігу інфекції в чутливих до патогену організмах є одним з пріоритетних завдань.

Крім того, існує нагальна необхідність в удосконаленні сучасних методів діагностики та засобів профілактики туберкульозу. Завдяки особливостям імунної відповіді до МРТ63 та МРТ83 створено діагностичні тести для діагностики захворювання на основі імуноензимного аналізу (ІЕА) та розроблено підходи для можливого їх використання у якості компонентів субодиничних вакцин.

Метою даної роботи – 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.

Як модельні системи для визначення імунобіологічних та біохімічних показників таргетного впливу МРТ63 та МРТ83 було використано ряд клітинних ліній з малігнізованим фенотипом та первинні культури ссавців: U937 (моноцитоподібні, гістіоцитарна лімфома людини), U2149 (макрофаго- та фібробластоподібні клітини, плеоморфна саркома людини), J774 (макрофагоподібні, ретикулярна саркома миші), A431 (епітеліальні клітини, аденокарцинома людини), 3T3 (ембріональні фібробласти миші), Р3Х63Аg8.653 (ліфмоцити, міелома миші) та перитонеальні макрофаги і адгезивні клітини селезінки миші. В дослідженні діагностичної значущості тест-систем на основі ІЕА було використано сироватки хворих на туберкульоз легень різної етіології, здорових пацієнтів, хворих на не туберкульозні захворювання легень; сироватки тварин, інфікованих *M.bovis*, атиповими мікобактеріями, лейкозних та здорових тварин. В роботі використано біохімічні, імунологічні, мікробіологічні, молекулярно-біологічні, спектральні та методи імуноцитохімії.

Методами протокової цитофлуориметрії та конфокальної мікроскопії показано, що антиген мікобактерій МРТ83 зв'язується з поверхнею

макрофагоподібних клітин лінії U2149 (гетерогенна лінія фібробласто- та макрофагоподібних клітин людини).

Показано, що МРТ63 зв'язується з окремою популяцією клітин селезінки миші. При подальшому дослідженні клітинних ліній, що є похідними епітеліоцитів, фібробластів, лімфоцитів, макрофаго- та моноцитоподібних клітин було виявлено, що МРТ63 специфічно зв'язується з невеликою субпопуляцією клітин в межах моноцитоподібної лінії U937, і не зв'язується з клітинами інших ліній. Не виявлено зв'язування МРТ63 з внутрішньоклітинними структурами перитонеальних макрофагів миші.

Виявлено, що після інкубація з МРТ63 (0,25 мкМ) упродовж 24 год відсоток клітин з високим рівнем експресії CD11b зростає. Використання антигену mCherry, що був виділений і очищений за тим же протоколом що і МРТ63 і МРТ83, дозволило виключити можливий вплив бактеріальних домішок. У трьох незалежних експериментах передінкубація з МРТ63 підвищувала відсоток клітин з високим рівнем експресії CD11b.

Відомо, що 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 необхідний час, вірогідно цей процес обумовлений змінами в експресії гену CD11b.

Аналогічний експеримент було проведено з МРТ83 і отримано принципово подібні результати. Збільшення представленості CD11b на поверхні клітин відбувається після 24 год стимуляції МРТ83, але якщо зменшити час інкубації з антигеном до 8 год або до 30 хв, ефект не спостерігається. Хоча після інкубації з МРТ63 рівень клітин з високою експресією CD11b був вище, ніж після інкубації з МРТ83, загалом, вірогідно, в обох випадках підвищення експресії CD11b є наслідком активації макрофагів, зумовленої стимуляцією МРТ63 та МРТ83.

Показано відсутність цитотоксичного ефекту мікобактеріальних антигенів на клітини лінії U937, A431, 3T3, а довготривала інкубація

антигенів МРТ63 та МРТ83 з макрофагоподібними клітинами J774 призводила до появи клітин з ознаками апоптичної загибелі.

Показано, що первинна культура макрофагів, а не малігнізовані макрофагоподібні клітини лінії J774 характеризуються підвищеною фагоцитарною активністю після впливу рекомбінантних МРТ63 та МРТ83.

Розроблено прототип тест-системи для серологічної діагностики туберкульозу у населення «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*». Порівняння дослідної тест-системи з референтними діагностикумами засвідчило, що запропонована нами тест-система перевершує референтні щодо критеріїв надійності. Специфічність тест-системи склала 69,5% у порівнянні з 45,16%, для референтних тест-систем №1 та №2, а чутливість – 95,5%, у порівнянні з референтними – 92,5% та 90,2% для тест-систем №1 та №2 відповідно.

Показано, що виявлення антитіл до збудника туберкульозу ВРХ *M. bovis* за допомогою серологічних методів діагностики, а саме, з використанням методу твердофазного ІЕА, є важливим додатковим способом контролю рівня захворюваності ВРХ туберкульозом, оскільки: дозволяє своєчасно виявляти інфікованих *M. bovis* тварин; в господарствах, що знаходяться в групі ризику, забезпечує виявлення анергічних до туберкуліну тварин, які є прихованими джерелами збудника цієї інфекції; в період проведення оздоровчих заходів дозволяє успішно проводити контроль епізоотичної ситуації.

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

*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.

Mycobacterioses (including TB) are the widespread infectious diseases of human being and animals. TB is a major reason of high levels of morbidity and mortality in the developing countries of the World. Cattle tuberculosis is a serious problem for agriculture of Ukraine and many other countries. This infectious disease annually induces significant economic losses.

Knowledge about mechanisms of pathogenesis and development of tuberculosis (TB) is rapidly growing. The arising of multidrug resistant strains of *Mycobacterium* (MDR-TB) promotes finding new effective therapeutic agents. Interactions of bacterial pathogenic factors with target molecules lead to particular effects in host. Thus, the investigation of features and functions of a number of tuberculosis bacilli antigens is a prerequisite for prevention and treatment of TB.

Identification of cellular and molecular targets for immunodominant proteins of *Mycobacterium tuberculosis complex* (a group of closely related strains characterized by a high rate of homology and identity of 16S rRNA) MPT63 and MPT83 could fill certain gaps in understanding the mechanism of tuberculosis pathogenesis. Also, it remains unclear whether some *M. tuberculosis* antigens, including MPT63 and MPT83, are involved in avoiding bacteria degradation in endosomes. Therefore, the study of the role of *M. tuberculosis* proteins with unknown functions in the development of infection in susceptible hosts is one of the priority tasks.

Improved tools for TB detecting are urgently needed. Due to the features of the immune response to target antigens, ELISA tests for the diagnosis of the disease and an information platform for their possible use as components of subunit vaccines were developed.

The goal of this study was to investigate the influence of *M. tuberculosis* antigens MPT63 and MPT83 on phagocytic and non-immune cells involved in the

development of mycobacterial infection and the development of diagnostic test systems for detection of antibodies to the pathogen in cattle and human sera.

As a model system for the determination of immunobiological and biochemical properties of MPT63 and MPT83 treatment a number of cell lines with tumor associated phenotype and primary mammalian cultures were used: U937 (monocyte-like, human histiocytic lymphoma), U2149 (macrophage and fibroblast-like cells, human pleomorphic sarcoma), J774 (macrophage, murine reticular sarcoma), A431 (epithelial cells, human adenocarcinoma), 3T3 (murine embryo fibroblasts), P3X63Ag8.653 (lymphocytes, murine myeloma) and peritoneal macrophages and adherent murine spleen cells. In the study of the diagnostic value of the ELISA test systems patients sera of pulmonary tuberculosis of different etiologies, healthy patients, patients with non-tuberculous diseases of the lungs were used; sera of infected with *M.bovis*, atypical mycobacteria, leukemia and healthy animals. Biochemical, immunological, microbiological, molecular biological, spectral and immunocytochemistry methods were used.

Used flow cytometry and confocal microscopy methods we showed that the protein of *M. tuberculosis* MPT83 binds to the surface of macrophage-like cells of U2149 cell line.

It is shown that MPT63 capable of binding to mouse spleen cells, characterized by a high level of granularity and probably belonging to a particular subpopulation of macrophages. In further study of cell lines, which are models of epithelial cells, fibroblasts, lymphocytes, macrophage and monocyte-like cells, it has been found that MPT63 specifically binds to a small subpopulation of cells within the monocyte-like line U937 and does not bind with cells of other lines. No binding of MPT63 to intracellular targets of murine peritoneal macrophages was detected.

Since the results of studying of the interaction of MPT63 with phagocytic cells suggest that this interaction takes place, it was investigated MPT63 treatment on process of cell's activation.

It was found after 24 h incubation with 0.25  $\mu$ M MPT63 the percentage of

cells with high CD11b expression increased. As a control antigen, mCherry, which, like MPT63, was expressed in *Escherichia coli* and, equally important, was isolated and purified by the same protocol. This allowed us to check the possible effects of various bacterial impurities that could have been included in the sample during antigen isolation. In three independent experiments, pre-incubation with MPT63 increased the percentage of cells with high levels of CD11b expression.

Changes in the expression of CD11b on the surface may occur a few minutes after stimulation, which occurs due to its intracellular store. Since, after stimulation of MPT63 to change the level of CD11b, time is required, this process is likely to be due to changes in the expression of the CD11b gene. A similar experiment was conducted with MPT83 and fundamentally similar results were obtained. As in the case of MPT63, during incubation with MPT83 for 30 min or 8 h the effect was not observed. Although, after incubation with MPT63, the level of cells with high CD11b expression was higher than after incubation with MPT83, in general in both cases CD11b expression increased as a result of activation of macrophages induced by MPT63 and MPT83 treatment.

The absence of cytotoxic effects of mycobacterial antigens on U937, A431, and 3T3 lines was demonstrated, and the long-term incubation of MPT63 and MPT83 antigens with J774 macrophage cells led to the identification of molecular features of apoptotic cell death.

It was shown primary culture but not malignant macrophages have higher phagocytic activity after 24 h rMPT63 and rMPT83full stimulation.

An industrial sample of a test system for serological diagnosis of tuberculosis was developed. The comparative characteristic of the experimental test system with reference diagnostic tools is carried out, from which it follows that the MPT83-MPT63 based test system offered by us exceeds the existing ones with respect to the reliability criteria. The specificity of the test system was 69.5% compared to 45.16% 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.

Hence, serological diagnostic identification of antibodies to cattle tuberculosis pathogen *M. bovis*, particularly using solid-phase ELISA, is an important complementary method of monitoring cattle for tuberculosis since it allows timely detection of *M. bovis*-infected livestock, and latent carrier animals; in households troubled by tuberculosis it enables detection of animals anergic to tuberculin, which are the hidden sources of pathogen; during implementation of health measures it allows for successful control of epizootic situation.

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

#### Список публікацій здобувача

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.
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.
3. Siromolot AA, Oliinyk OS, Kolibo DV, Gerilovich AP. Improvement and optimization of antigenic composition for serodiagnosis of tuberculosis. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety.* 2016;2(4):11-5.
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.
6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

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

12. Siromolot AA, Kolybo DV. Recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* MPT63 and MPT83 increase phagocytosis efficiency, activation and maturation of macrophages. Proceedings of the 14<sup>th</sup> Horizons in Molecular

Biology; 2017 Sep 11-14; Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Goettingen, Germany. 2017, P 72.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП .....	19
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	25
1.1. Імунобіологія та епідеміологія туберкульозу.....	25
1.1.1. Деякі аспекти епідемії туберкульозу.....	25
1.1.2. Клітини чутливих до <i>M.tuberculosis</i> організмів, що залучені до патогенезу та контролю перебігу мікобактеріальної інфекції .....	27
1.2. Характеристика окремих компонентів протеому мікобактерій та патоген-асоційованих молекулярних патернів <i>M.tuberculosis complex</i> .....	30
1.2.1. Характеристика та властивості секреторного протеїну <i>M.tuberculosis</i> МРТ63 .....	30
1.2.2. Характеристика та властивості ліпопротеїну <i>M.tuberculosis</i> МРТ83 .....	32
1.2.3. Будова, імунобіологічні властивості та функції інших антигенів <i>M.tuberculosis</i> .....	35
1.3. Підходи до розробки альтернативних діагностикумів туберкульозу легень.....	40
1.3.1. Існуючі діагностичні методи обстеження хворих при туберкульозі.....	40
1.3.2. Удосконалення компонентів імуноензимних тест-систем для серологічної діагностики туберкульозу .....	43
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	47
2.1. Матеріали.....	47
2.1.1. Реактиви .....	47
2.1.2. Обладнання.....	48
2.1.3. Лабораторні тварини, культури клітин еукаріот, експресійні штами бактерій та вектори .....	49
2.1.4. Програмне забезпечення .....	50
2.2. Методи.....	50
2.2.1. Створення генетичної конструкції, що кодує повнорозмірний антиген <i>M.tuberculosis</i> МРТ83 .....	50

2.2.2. Створення генетичних конструкцій, що кодують флуоресцентні похідні МРТ63 та МРТ83, злитих з червоним флуоресцентним протеїном mCherry .....	51
2.2.3. Удосконалення генетичної конструкції, що кодує рекомбінантний злитий протеїн МРТ83-МРТ63 .....	52
2.2.4. Електрофоретичне розділення ДНК в поліакриламідному та агарозному гелях .....	52
2.2.5. Електрофоретичне розділення протеїнів у ДСН-ПААГ .....	53
2.2.6. Трансформація клітин <i>E.coli</i> та селекція позитивних клонів, що експресують рекомбінантні антигени .....	53
2.2.7. Індукція експресія рекомбінантних антигенів в прокаріотичній системі експресії <i>E.coli</i> .....	54
2.2.8. Виділення та очищення рекомбінантних протеїнів методом метал-афінної хроматографії .....	54
2.2.9. Вестерн-блот аналіз та хемілюмінесцентний аналіз .....	55
2.2.10. Ковалентне мічення протеїнів флуорофором FITC .....	56
2.2.11. Одержання часток на основі фосфату кальцію та імобілізація на них рекомбінантних антигенів <i>M.tuberculosis</i> .....	57
2.2.12. Зимографія .....	58
2.2.13. Одержання первинної культури перитонеальних макрофагів миші .....	58
2.2.14. Культивування культур еукаріотичних клітин .....	59
2.2.15. Визначення цитотоксичної/цитостатичної активності рекомбінантних протеїнів методом МТТ-тесту .....	59
2.2.16. Визначення пороутворюючих властивостей МРТ63 та МРТ83 методом спектрофлуориметрії .....	60
2.2.17. Конструкція імунної фагової бібліотеки .....	61
2.2.18. Одержання фагових частинок .....	61
2.2.19. Селекція МРТ63 та МРТ83 специфічних клонів-продуцентів scFv антитіл .....	62
2.2.20. Фільтр-аналіз (Lift Assay) колоній .....	62
2.2.21. Імунізація лабораторних тварин та отримання антисироваток до МРТ63, МРТ83 та МРТ83-МРТ63 .....	63

2.2.22. Прямий та непрямий імуноензимний аналіз.....	64
2.2.23. Протокова цитофлуориметрія .....	65
2.2.23.1. Оцінка впливу МРТ63 і МРТ83 на фагоцитарну активність макрофагів .....	65
2.2.23.2. Оцінка впливу мікобактеріальних антигенів на експресію маркерів активації макрофагів.....	65
2.2.23.3. Пошук поверхневих та внутрішньоклітинних мішеней рекомбінатних протеїнів МРТ63 та МРТ83 .....	66
2.2.24. Підготовка та аналіз фіксованих препаратів для конфокальної мікроскопії .....	67
2.2.25. Статистична обробка отриманих результатів .....	68
<b>РОЗДІЛ 3 СТВОРЕННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ АНТИГЕНІВ ТА ЇХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ПОХІДНИХ .....</b>	<b>69</b>
3.1. Конструювання та характеристика повнорозмірного антигену <i>M.tuberculosis</i> МРТ83.....	69
3.2. Конструювання злитих протеїнів на основі антигенів <i>M.tuberculosis</i> МРТ63 та МРТ83 та червоного флуоресцентного протеїну .....	71
3.3. Створення генетичної конструкції, що кодує химерний протеїн МРТ83-МРТ63.....	77
3.4. Висновки до розділу .....	80
<b>РОЗДІЛ 4 ВЗАЄМОДІЯ АНТИГЕНІВ <i>M.TUBERCULOSIS</i> МРТ63 ТА МРТ83 ІЗ КЛІТИНАМИ-МІШЕНЯМИ .....</b>	<b>81</b>
4.1. Дослідження взаємодії флуоресцентних похідних <i>M.tuberculosis</i> МРТ63 та МРТ83 з первинними культурами клітин ссавців.....	81
4.2. Дослідження взаємодії флуоресцентно-міченого МРТ63 з поверхнею малігнізованих клітин імунної системи.....	83
4.3. Пошук внутрішньоклітинної мішені МРТ63-FITC .....	86
4.4. Визначення спорідненості флуоресцентно-міченого МРТ83 з клітинами лінії U2149 .....	88
4.5. Висновки до розділу .....	91
<b>РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ МРТ63 ТА МРТ83 НА АКТИВАЦІЮ, ДОЗРІВАННЯ ТА ЕНДОЦИТАРНУ АКТИВНІСТЬ ФАГОЦИТІВ.....</b>	<b>93</b>
5.1. Дослідження впливу рекомбінатних антигенів <i>M.tuberculosis</i> МРТ63 та МРТ83 на фагоцитоз .....	93

5.1.1. Дослідження фагоцитозу кальцій-фосфатних наночасток кон'югованих з МРТ63 та МРТ83 .....	95
5.1.2. Дослідження впливу МРТ63 та МРТ83 на фагоцитоз клітин <i>E.coli</i> .....	101
5.2. Дослідження впливу МРТ63 та МРТ83 на експресію маркерів активації макрофагів CD11b та F4/80 .....	103
5.3. Оцінка впливу антигенів <i>M.tuberculosis</i> МРТ63 та МРТ83 на життєздатність клітин імунної системи, сполучної та епітеліальної тканин .....	107
5.4. Дослідження апоптичного ефекту мікобактеріальних антигенів на клітинах J774, A431 та 3T3 .....	110
5.5. Оцінка пороутворювальної здатності рекомбінантних антигенів МРТ63 та МРТ83 .....	112
5.6. Активність матриксних металопротеїназ у кондиціонованому середовищі J774 після стимуляції МРТ63 та МРТ83 .....	114
5.7. Вивчення впливу мікобактеріального антигену МРТ63 на сигнальну трансдукцію MAP кінази ERK1/2 та ядерного фактору κB .....	116
5.8. Висновки до розділу .....	118
<b>РОЗДІЛ 6 ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МІКОБАКТЕРІАЛЬНИХ АНТИГЕНІВ ТА ОСОБЛИВОСТЕЙ ГУМОРАЛЬНОЇ ВІДПОВІДІ .....</b>	<b>119</b>
6.1. Експресія та порівняльна характеристика отриманого злитого рекомбінантного протеїну МРТ63-МРТ83 (повнорозмірний) .....	119
6.2. Варіабельність розпізнавання антигенів <i>M.tuberculosis</i> поліклональними та scFv антитілами миші .....	122
6.3. Висновки до розділу .....	128
<b>РОЗДІЛ 7 РОЗРОБКА ТА ВИПРОБУВАННЯ ІМУНОЕНЗИМНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ СПЕЦИФІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ВРХ ТА ЛЮДИНИ .....</b>	<b>130</b>
7.1. Визначення чутливості та специфічності дослідного зразка тест-системи «IB-Chem Anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> » для діагностики туберкульозу легень у населення .....	130
7.2. Порівняння діагностичної ефективності розробленого дослідного зразка тест-системи та референтних тест-систем для діагностики туберкульозу легень .....	133

7.3. Випробування експериментальної тест-системи «ІВ-Chem Anti- <i>Mycobacterium bovis</i> » для специфічної діагностики туберкульозу ВРХ....	135
7.4. Висновки до розділу .....	140
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ .....	142
ВИСНОВКИ.....	150
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	152
ДОДАТОК 1.....	170

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТ – антитіла

ВРХ — велика рогата худоба

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДСН — додецилсульфат натрію

ЕДТА — етилендіамінтетраоцтова кислота

ЗФР — забуферений фосфатний розчин

ІЕА – імуноензимний аналіз

ММП — матриксна металопротеїназа

МТТ – 3-(4,5-діметилтіазоліл-2)-2,5-діфенілтетразоліум бромід

ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція

ПСА — персульфат амонію

РНК – рибонуклеїнова кислота

ТБ — туберкульоз

ТЕМЕД — тетраметилетилендіамін

ТМБ – тетраметилбензидин

ФБС – фетальна бичача сироватка

BCG — *Bacillus Calmette-Guérin* (вакцинний штам *M. bovis*)

BSA – bovine serum albumin (сироватковий альбумін бика)

FITC – fluorescein isothiocyanate (флуоресцеїн ізотіоціанат)

IFN — interferon (інтерферон)

IL — interleukin (інтерлейкін)

IPTG — isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (ізопропіл- $\beta$ -D-тіогалактозид)

LB – lysogeny broth (лізогенічне поживне середовище для бактерій)

MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight (матрична лазерна десорбційна іонізаційна часопротітна мас-спектрометрія)

МАРК - mitogen-activated protein kinases (протеїнкінази, що активуються мітогенами)

PPD – purified protein derivative (очищений туберкулін)

TLR — Toll like receptor (Толл-подібні рецептори)

TNF — tumor necrosis factor (фактор некрозу пухлин)

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Туберкульоз, збудником якого є плеоморфна облигатно аеробна паличка, факультативний внутрішньоклітинний паразит *Mycobacterium tuberculosis*, досі залишається однією з головних причин смертності серед населення у країнах, що розвиваються. Патоген ефективно протистоїть захисним механізмам імунітету людини, зберігає свою життєздатність і патогенність роками.

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. [1]. Туберкульоз є соціальною хворобою, захворюваність на яку чітко зв'язана з незадовільними соціальними умовами мешкання та низьким і середнім рівнем доходу населення. В Україні захворюваність на туберкульоз в 2015 році відповідала 70,5 хворих на 100 тис. населення (в США – 3,5 особи на 100 тис.), серед них – 13,0 осіб у поєднанні зі СНІДом, що до 20-30 разів перевищує аналогічний показник серед неінфікованих осіб та є однією з провідних причин смерті серед людей з ВІЛ (35 % випадків) [2, 3, 4].

Низька ефективність контролю над епідемічною ситуацією пов'язана не лише з відсутністю ефективних діагностиків [5], але й з недостатнім розумінням молекулярних механізмів патогенезу мікобактеріальної інфекції.

За даними державної служби статистики України поголів'я ВРХ в Україні на січень 2016 року складає 3 млн. 750,3 тис. голів. Туберкульоз ВРХ є серйозною проблемою для сільського господарства як в Україні, так і у багатьох країнах світу. Ця інфекційна хвороба щорічно призводить до значних економічних збитків. 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. Ситуацію ускладнює відсутність простого та доступного способу діагностування туберкульозу

ВРХ. Це значно ускладнює моніторинг інфекційної ситуації та можливість своєчасного проведення заходів щодо попередження розповсюдження цієї інфекції. Оскільки в сучасних господарствах значна частина тварин може бути сенсibilізована атипovими мікобактеріями, існує необхідність диференціації алергічних та параалергічних реакцій на туберкулін. Саме ця частина поголів'я може потребувати поглиблених лабораторних тестувань за допомогою імуноензимного аналізу з використанням імунодомінантних протеїнів *M. tuberculosis*/*M. bovis* МРТ63 та МРТ83.

Завершення проекту з секвенування геному мікобактерії [6, 7] стало поштовхом у напрямку ідентифікації, дослідження функцій і властивостей нових антигенних мішеней для створення вакцин та діагностичних тестів [8]. Вивчення імунобіологічних властивостей антигенів *M. tuberculosis complex* для з'ясування молекулярних механізмів патогенезу інфекції, а також для подальшої розробки субдинічних вакцин та діагностикумів є актуальним завданням сучасних молекулярної біології, імунології та клітинних біотехнологій.

**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 завдання 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 прокариотичних 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 еукаріот (культивування первинних та малігнантних еукаріотичних клітин),

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

**Наукова новизна одержаних результатів.** В роботі вперше отримано генетичні конструкти рекомбінантних антигенів *M.tuberculosis* МРТ63 та МРТ83 злитих з червоним флуоресцентним протеїном mCherry.

Вперше було виявлено потенційні клітини-мішені імунодомінантних антигенів *Mycobacterium spp.* МРТ63 та МРТ83. Розширено існуючі уявлення щодо посилення фагоцитозу клітинами природного імунітету мікобактеріальними протеїнами.

Було удосконалено генетичну конструкцію, що кодує злитий протеїн МРТ83-МРТ63 на основі повнорозмірних рекомбінантних антигенів мікобактерій. Проаналізовано переваги його використання для імуноензимних тестів у порівнянні з існуючими аналогами.

**Практичне значення одержаних результатів.** На основі отриманих продуктів злиття антигенів *M.tuberculosis/M.bovis* МРТ63 та МРТ83 створено унікальні тест-системи «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*» та «ІВ-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 дисертаційної роботи, поставлені мета та завдання дисертаційного дослідження. Усі наукові результати дисертаційної роботи отримано автором самостійно або за його

безпосередньої участі. Зокрема, дисертантом проведено інформаційний пошук, експериментальні дослідження та аналіз результатів. Автором отримано флуоресцентні похідні мікобактеріальних антигенів, їх генетичні конструкції та штами-продуценти. Встановлено здатність MPT63 та MPT83 посилювати фагоцитарну активність та дозрівання макрофагів. Удосконалено антигенну субстанцію для серологічної діагностики легеневого туберкульозу.

Автор щиро вдячний усім співробітникам лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна. Зокрема, інж. І кат. Криніній О.І. за допомогу у роботі оформлення технічної документації і лабораторного регламенту промислового зразку тест-системи для діагностики туберкульозу, м.н.с. Манойлову К.Ю. за консультації у роботі з еукаріотичними клітинами, Чудіній Т.О. за допомогу у тестуванні панелі сироваток пацієнтів щодо виявлення антитіл до мікобактерій та аналізу результатів, к.б.н., ст.н.с. Олійник О.С та к.б.н., н.с. Редчуку Т.А. за участь у аналізі результатів, Лабинцеву А.Ю. за консультаційну допомогу у статистичних методах обробки даних. Особливу подяку дисертант висловлює д.б.н., професору Колибо Денису Володимировичу за участь у плануванні стратегії роботи, аналізі й узагальненні результатів.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати наукових досліджень неодноразово були представлені на ряді Всеукраїнських та міжнародних наукових з'їздах, конференціях, симпозіумах, а саме: міжнародному симпозіумі «2<sup>nd</sup> 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), V міжнародній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, Україна, 2017), XIII міжнародній науковій конференції «Молодь та поступ біології» (Львів, Україна, 2017), міжнародній імунологічній школі «9<sup>th</sup> EFIS-EI South Eastern Europe Immunology Scholl (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), а також на наукових семінарах відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. 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.

## РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Імунобіологія та епідеміологія туберкульозу

#### 1.1.1. Деякі аспекти епідемії туберкульозу

Туберкульоз — небезпечне інфекційне захворювання, яке спричиняється групою близькоспоріднених мікроорганізмів, які відносяться до *Mycobacterium tuberculosis complex* і характеризується утворенням одного або багатьох осередків запалення в різних органах, але найчастіше у лімфатичних вузлах і легеневій тканині [9]. За даними ВООЗ, туберкульоз є другою за значимістю причиною смерті від одного інфекційного агента, поступаючись лише ВІЛ/СНІДу. Захворювання поширене в усіх країнах світу, до того ж, часто уражуються діти. У 2015 році було зафіксовано 10,4 млн нових випадків захворювання на туберкульоз і приблизно 1,3 млн смертей серед населення з ВІЛ-негативним та 374 тис. з ВІЛ-позитивним статусом [10]. Також серйозну загрозу становить поширення мультирезистентного туберкульозу (MDR-TB). За даними ВООЗ, в Україні MDR-TB мають 16% хворих, яким вперше встановили діагноз туберкульозу, та 44% хворих із рецидивом захворювання [4].

Туберкульоз ВРХ, викликаний збудником *M.bovis*, призводить до значних економічних збитків у сільському господарстві, особливо в аграрних країнах. Крім того, збудник *M.bovis* за певних обставин може становити небезпеку для здоров'я населення. Так, у ряді робіт показана можливість передачі інфекції від великої рогатої худоби людині, внаслідок, наприклад, вживання непастеризованого молока [11-13]. Деякі автори припускають, що передача збудника можлива і від людини до ВРХ, апелюючи до кореляції захворюваності туберкульозом ВРХ та людини по регіонах України. Навіть при мінімізації ризику передачі інфекції людині (за рахунок пастеризації

молока і своєчасного вибраковування зараженого поголів'я), туберкульоз ВРХ приводить до істотних фінансових втрат [14].

Через погано організований контроль над епідеміологічною ситуацією, недостатню кількість діагностиків, дороговизну існуючих ефективних методів виявлення і лікування туберкульозу це захворювання залишається невирішеним питанням для ряду країн, що розвиваються.

*M. tuberculosis* проникає до легень через повітряні шляхи, розмножується там у альвеолах, поглинається макрофагами природної імунної системи, де розпізнається рецепторами (манозо-зв'язуючими або TLR). Мікобактерії можуть виживати у фагосомах макрофагів, уникаючи дії лізосомальних ферментів та хімічно активного азоту. Дендритні клітини транспортують патоген зі слизової оболонки легень до лімфатичних вузлів, де презентують їх CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> Т-клітинам набутого імунітету [15].

Роль імунної відповіді є визначальним фактором у процесі розвитку хвороби: у 90% інфікованих туберкульозною паличкою хвороба не розвивається протягом усього життя людини. Тим не менш, ризик розвитку значно збільшується, коли туберкульозна інфекція співіснує зі змінами імунної системи, наприклад при ко-інфекції з ВІЛ [16].

Імунобіологія туберкульозної інфекції для людини та ВРХ подібна. Так, мінімальна кількість бактерій, необхідна для зараження, близька для людини та ВРХ. При потрапленні збудника туберкульозу ВРХ або населення демонструє значні популяційні відмінності у проявах імунних реакцій. При туберкульозі відмічено виражений тропізм збудника до тканин легень [17]. Туберкульозні гранульоми, що утворюються в легенях тварин та людини, гетерогенні за гістологічною будовою, мають складну будову. Клінічні прояви захворювання характеризуються значним поліморфізмом [18]. Все це ускладнює своєчасну діагностику та лікування туберкульозу.

### 1.1.2. Клітини чутливих до *M.tuberculosis* організмів, що залучені до патогенезу та контролю перебігу мікобактеріальної інфекції

Будь-який тип імунних клітин спрямовано діє на елімінацію збудника, сприяє розриву його зв'язків з клітинами. Патогенний мікроорганізм навпаки, уникає виведення з організму, адаптує умови середовища організму до найліпшого перебування в ньому, намагається протистояти впливам клітинного і гуморального імунітету.

Хоча до недавнього часу макрофаги вважали основними мішенями мікобактерій, інші типи клітин також можуть бути уражені ними, а значить і відігравати певну роль у розвитку хвороби. За збільшення кількості нейтрофілів відбувається затримка росту *M. tuberculosis* [19]. Нейтрофіли сприяють контролю інфекції через продукцію хемокінів, індукцію формування гранульоми та передачу власних бактерицидних молекул макрофагам [20].

Макрофаги є найбільш описаною та охарактеризованою мішенню мікобактерій [21, 22]. Початкова взаємодія клітин з бактеріями відбувається за рахунок клітинних рецепторів, таких як рецептори комплементу, манозо-зв'язуючі рецептори, поверхнево-активних протеїнів, CD14, CD43, TLR. Взаємодії мікобактерій з TLR вивчалися протягом декількох років. TLR2 та TLR4 активуються кількома компонентами *M. tuberculosis*, серед них 19-кДа ліпопротеїн та ліпоарабіноманан, а ті в свою чергу сприяють утворенню ІЛ-12, прозапального цитокіну, що ініціює перетворення наївних Т-лімфоцитів в Th1 та активації натуральних кілерів (NK), тобто посилює клітинну ланку імунної відповіді [23-24].

Дендритні клітини з уражених на туберкульоз тканин можуть брати участь у імунному захисті. Дендритні клітини зв'язуються з антигеном через лектинові рецептори С-типу, а також Fc $\gamma$ - і Fc $\epsilon$ -рецептори і поглинають бактерії шляхом ендоцитозу [25]. Як тільки антигени захоплюються і поглинаються, дендритні клітини стають зрілими (зазнають фенотипових і

функціональних змін) і активно мігрують до периферичних лімфатичних вузлів [20].

Основна функція НК полягає у клітинній цитотоксичності по відношенню до клітин-мішеней, і вони є першою популяцією клітин, що секретує IFN- $\gamma$  протягом розвитку імунної відповіді [26]. Довгий час вважали, що НК-клітини відіграють роль лише у попередженні розвитку вірусних та онкологічних захворювань. Але зовсім недавно, в зв'язку з проблемою туберкульозу, виникли нові твердження щодо ролі НК в бактеріальній інфекції. Було показано, що кількість НК-клітин зростає в легенях C56BL/6 мишей протягом 21 доби після аерозольного інфікування *M. tuberculosis complex*. [27] Тим не менш, виснаження НК-клітин не мало ніякого негативного ефекту на бактеріальне навантаження легень, що може свідчити про те, що НК активізуються на початку відповіді, але є не суттєвими для резистентних властивостей хазяїна [28].

Туберкульоз – не є органоспецифічним інфекційним захворюванням; крім класичних імунних клітин організму вражає клітини сполучної тканини та епітелію. Альвеолярні епітеліоцити формують селективний бар'єр, що запобігає проникненню збудника до паренхіми органів. Окрім того, епітелій повітряношляхів є першими клітинами, з якими взаємодіє збудник через TLR1, TLR2, TLR4, TLR9, а також через RIG-I-подібні, NOD-подібні та лектин подібні рецептори, що розташовані на поверхні цих клітин [29-31]. Епітелій дихальних шляхів робить внесок у регуляцію імунної відповіді шляхом синтезу про- та анти- запальних цитокінів та безпосереднім рекрутингом лейкоцитів за допомогою хемокінів [32]. Недавнє дослідження показало, що опосередкований TLR2 синтез CXCL5 клітинами легеневого епітелію є необхідним для рекрутингу поліморфноядерних фагоцитів у відповідь на інфекцію *M. tuberculosis*. [33] Епітеліоцити здатні утворювати хімічно активний азот (NO) – ключовий метаболіт природного імунітету для контролю поширення та розмноження збудника [34]. Крім того, було показано, що епітеліальні клітини продукують ліпокалін-2, який зв'язує

мікобактеріальні протеїни, які виводять залізо з клітин-господаря, тим самим обмежуючи його як джерело метаболізму та пригнічуючи ріст патогенів [35].

Фібробласти формують найпоширеніший пул клітин у сполучній тканині, який може бути заражений і підтримувати активне розмноження та виживання *M. tuberculosis*. Кооперативна взаємодія фібробластів з іншими імунними клітинами, мабуть, найкраще ілюструється як невід'ємний компонент структур гранульоми, утворених у відповідь на мікобактеріальну інфекцію [36]. Описано нагромадження колагену, синтезованого фібробластами всередині гранульоми [37]. Відповідь фібробластів на збудник цілком може регулюватися мікобактеріальними антигенами, які, в тому числі, залежать від штаму мікобактерій. Оскільки інфікування тварин менш вірулентним штамом мікобактерій H37Ra призводить до стимуляції синтезу колагену, то вірулентний штам H37Rv сприяє деградації колагену; останній процес приписаний як передумова формування порожнин та мікобактеріальної дисемінації [38]. Цьому процесу сприяє посилення синтезу ММП як фібробластами, так і епітеліальними клітинами з подальшим сприянням процесу кавітації [39].

Хоча первинна інфекція виникає в легенях, поширення бацил на інші частини тіла є одним з ключових подій в патогенезі туберкульозу. Преференційне націлювання мікобактерій на макрофаги добре описано, але й інші клітини, крім професійних фагоцитів і класичних імунних клітин можуть інтерналізувати збудник. На даний момент відомо, що взаємодія між *M. tuberculosis* та іншими соматичними клітинами організму має значний вплив на реакцію хазяїна для контролю інфекції, включаючи місцеві імунні регуляторні ефекти і, таким чином, сприяє патогенезу інфекції [40].

Визначення клітин-мішеней є обов'язковим елементом у вивченні взаємозв'язків між збудником та чутливим до нього організмом. За даними літературних джерел відомо, що головною мішенню для туберкульозу є

макрофаги. Тому не виключено те, що модельні протеїни, зокрема МРТ63 і МРТ83, можуть зв'язуватися з цими клітинами.

## 1.2. Характеристика окремих компонентів тубпротеому та патоген-асоційованих молекулярних патернів *M.tuberculosis complex*

### 1.2.1. Характеристика та властивості секреторного протеїну *M.tuberculosis* МРТ63

МРТ63 є специфічним для *Mycobacterium spp.* секреторним протеїном, із невстановленою функцією. В 1991 році він був вперше ідентифікований та частково охарактеризований Nagai та співавторами [41]. Ця ж група авторів впровадила терміни МРТ та МРВ, що відносяться до протеїнів *M. tuberculosis* та *M. bovis* відповідно. Аналіз нуклеотидної послідовності гену *mpt63* показав відкриту рамку зчитування і було показано, що протеїн складається з 159 амінокислот та містить 2 компоненти: сигнальний пептид довжиною в 29 амінокислотних залишків та власне протеїн, що складається із 130 амінокислот [41, 42]. В їх роботі було показано, що протеїн з молекулярною масою приблизно 16 кДа виділяється клітинами *M. tuberculosis* у культуральне середовище, а також має ідентичні антигенні властивості та масу з аналогічним протеїном *M. bovis BCG*.

Ген *mpt63* присутній лише в геномах *M.tuberculosis complex*, групи близькоспоріднених штамів, що характеризуються високим ступенем гомології та ідентичністю 16S рРНК, але відсутній у *M. avium* [43]. В геномі *M. leprae* є псевдоген *mpt63*, який не транлюється в протеїн [44]. В протеомах *M. smegmatis*, та *M. avium* виявлено гомологічні МРТ63 молекули [45], хоча із антигенами останнього виду МРТ63 не має спільних епітопів. Це є дуже важливим, адже зазвичай хибно позитивні результати діагностування туберкульозу за допомогою шкірного тесту пов'язані саме із атиповими мікобактеріями. Kawajir запропонував визначити ген та відповідний протеїн

у *M. tuberculosis* BCG як mpb63 та MPB63, або mpb/t63 й MPT/B63 [46]. Порівняння нуклеотидних послідовностей генів, що кодують протеїни MPT63 та MPB63 в *M. tuberculosis* та *M. bovis* BCG виявило розбіжність лише в положенні 474, де аденін заміщено на тимін. Амінокислотна послідовність обох протеїнів є ідентичною [46, 47].

В роботі Horwitz та співавторів було показано, що MPT63 є секреторним протеїном мікобактерій: його було ідентифіковано у фільтраті культурального середовища *M. tuberculosis*, крім того, незрілий протеїн несе NH<sub>2</sub>-кінцевий пептид, що є сигналом для його секреції у позаклітинний простір [48]. Третинна структура MPT63 представлена двома антипаралельними β-листами, впорядкованими у імуноглобуліноподібний β-сандвіч [49].

Електростатичний поверхневий потенціал MPT63 розподіляється нерівномірно: порожнина має негативний заряд, а канал – позитивний. Спираючись на це, можна припустити, що такий канал є сайтом зв'язування пептидів, ліпідів, вуглеводів чи кофакторів [49].

Було показано, що MPT63 стимулює розвиток гуморальної імунної відповіді у морських свинок, інфікованих вірулентними *M. tuberculosis* [48]. Шляхом картування T-епітопів виявлено імунодомінантну ділянку в межах перших 30 N-кінцевих амінокислотних залишків зрілого протеїну. Ці залишки локалізовані у перших трьох β-складках протеїну. Разом із такими антигенами *M. tuberculosis*, як CFP10 та ESAT-6, MPT63 активує мастоцити та сприяє вивільненню з їх гранул гістаміну та гексамінідази [50].

Із зазначеного вище можна зробити висновок, що структурна подібність MPT63 до протеїнових молекул надродини імуноглобулінів дає підстави вважати, що цей антиген бере участь у взаємодії з клітинами хазяїна

### 1.2.2. Характеристика та властивості ліпопротеїну *M. tuberculosis* MPT83

Ліпопротеїни, в тому числі, MPT83, що асоційований з клітинною стінкою *M. tuberculosis*, є важливим класом лігандів TLR2 [51]. Було продемонстровано, що MPT83 індукує продукцію прозапального цитокіна TNF- $\alpha$ , що бере участь у формуванні гранульоми та нейтралізація якого відображається у підвищенні сприйняття до розвитку інфекції, та IL-6 – необхідного для створення захисних Th1-опосередкованих імунних реакцій після вакцинації субодиничними вакцинами проти *M. tuberculosis* [52].

Більш того, індукція цитокінів рекомбінантним аналогом MPT83 була значно меншою у макрофагах TLR2-нокаутних мишей, ніж у макрофагах дикого типу [53]. Довготривала інкубація (>24 год.) макрофагів RAW264.7 або макрофагів дикого типу та TLR2<sup>-</sup> мишей MPT83 відзначилося на значному прирості індукованої IFN- $\gamma$  експресії MHC-II та збільшенні здатності макрофагів презентувати сигнальний пептид MPT83 CD4<sup>+</sup> Т-клітин [53, 54]. Тобто ці результати свідчать, що MPT83 є агоністом TLR2, який спонукає продукування макрофагами цитокінів та впливає на їх функцію.

Класичними активаторами каскаду MAP кіназ є PAMP (pathogen associated molecular patterns) до яких належить ЛПС (ліпополісахарид) клітинної стінки бактерій, а також секреторні та структурні компоненти мікроорганізмів, які зв'язується з TLR. З дисфункцією TLRs пов'язано розвиток деяких захворювань. Пацієнти з спадковою недостатністю MyD88, IRAK-4, білків, що забезпечують транслокацію TLRs з ендоплазматичного ретикулуму до плазматичної мембрани, сприйнятливі до рецидивуючих бактеріальних або вірусних інфекцій [55]. Постійна активація TLR7 та TLR9 реактивних В-лімфоцитів лежить в основі розвитку системних аутоімунних захворювань. Більш того, онкогенні мутації MyD88 відбуваються в В-клітинах дифузної крупноклітинної лімфоми та інших злоякісних форм раку лімфоїдної природи [56].

Продемонстровано, що rMPT83 через TLR2 залежний шлях впливає на підвищення активності різноманітних MAP кіназ. Показано зростання активної фосфорильованої форми p38 та ERK1/2 через 30 хв після стимулювання клітин RAW264.7 рекомбінантним MPT83, а JNK – через 10 хв після індукції цим ліпопротеїном [53]. TLR2 залежний шлях впливу rMPT83 було доведено з використанням антитіл до різних класів TLRs. Антитіла до TLR4 не сприяли зменшенню вмісту фосфорильованих форм p38 та JNK стимульованих rMPT83 клітинами RAW264.7, а антитіла, специфічні до TLR2 – блокували дію мікобактеріального білка, про що свідчить низький рівень активованих вищезгаданих MAP кіназ [53]. Крім того анти-TLR2 антитіла практично не змінювали концентрацію фосфорильованої ERK1/2 при одночасній стимуляції rMPT83, що може свідчити про інші механізми активації та інші рецептори ERK1/2 каскаду [53].

Цікавим фактом виявилось і те, що rMPT83 сприяє транслокації регуляторної субодиниці транскрипційного фактору NF-κB [53]. Цей транскрипційний фактор важливий для транскрипції генів прозапальних цитокінів і ко-стимуляторних молекул. Промоторні ділянки генів для синтезу прозапальних цитокінів IL-12 p40 та TNF-α містять сайти для зв'язування NF-κB [57-59]. Показано, що локалізація p65 субодиниці NF-κB в ядрах стимульованих білком rMPT83 клітин відбувається після 15 хв індукції ліпопротеїном, але через годину рівень регуляторної субодиниці в ядрах зникає. В контрольних клітинах, не стимульованих мікобактеріальним антигеном MPT83, p65-субодиниця була локалізована переважно в цитоплазмі. Паралельно показано зростання експресії та активації NF-κB клітинами, після індукція ліпопротеїном [53]. Активація NF-κB відбувається внаслідок від'єднання IκB після фосфорилування його ІКК (IκB кіназний комплекс), яка була активована фосфорилуванням безпосередньо ERK1/2 [60, 61]. Сигнальний каскад Ras/Raf/MEK/ERK активується через зв'язування з відповідними рецепторами ростових факторів, гормонів та цитокінів, останні

з яких можуть бути відповіддю клітини на компоненти PAMP, можливо, включаючи структурні елементи і продукти експресії мікобактерій.

Chambers та співавтор [62] припустили, що оскільки MPT83 є глікозильованим ацетильованим протеїном, він може індукувати експресію мембранної металопротеїнази 9 (ММП9) через взаємодію з TLR2, TLR1 чи TLR4. Ними справді було виявлено, що під дією MPT83 індукція експресії MMP9 відбувається, але без участі TLR4. І досить несподівано також було з'ясовано, що рекомбінантний (неглікозильований і неацетильований) MPT83 діє подібно до нативного MPT83. Крім того методом поверхневого плазмонного резонансу було продемонстровано, що рекомбінантний MPT83 здатний зв'язуватись з TLR2 людини з афінністю близько  $4,42 \times 10^{-8}$  М [53].

За допомогою металоафінної хроматографії було очищено та в подальшому розділено на SDS-PAAG електрофорезі рекомбінантні протеїни *M. tuberculosis*. Всі сім досліджуваних антигенів (ESAT-6, CFP10, TB10.3, TB10.4, MTSP11, MPT70, та MPT83) давали позитивну реакцію в підшкірній тест-системі, випробуваній на морських свинках [63].

MPT70 та MPT83 вважаються найбільш вивченими мікобактеріальними антигенами. Вони мають високий ступінь експресії в *M. bovis* та значно менший – в *M. tuberculosis*. Ці протеїни кодується двома генами в опероні, що складається з шести генів: *mpb70* і *mpb83*, що кодують попередники білків з типовими сигнальними пептидами [64]. MPT70 – розчинний протеїн, зв'язаний з сигнальною пептидазою-I, тоді як MPT83 – глікозильований ліпопротеїн, зв'язаний з пептидазою-II, і розташований на поверхні, можливо сполучений за допомогою N-термінального цистеїну з ліпідним хвостом, розташованим в мікобактеріальній зовнішній мембрані [65]. Експресія цих генів контролюється транскрипційним регулятором SigK, точкові мутації якого пояснюють, чому деякі різновиди BCG продукують мізерну кількість MPT70 і MPT83 [30]. Відповідь Т-лімфоцитів і антитіл на ці

протеїни може розглядатись як чутливий і специфічний метод діагностики туберкульозу великої рогатої худоби [66].

Ген *mpt83* (Rv2873) кодує ліпопротеїн MPT83 *M. tuberculosis*. Відповідний ідентичний йому ген *mpb83* *M. bovis* експресується по-різному: в підштамах *M. bovis*, *BCG-Tokyo* та *BCG-Moreau* висока продукція, а у *BCG-Danish-1331* — низька експресія MPT83 [67].

MPT83 також було описано як фактор адгезії [68] та як чинник індукції апоптозу у інфікованих *M. tuberculosis* макрофагах через TLR2/p38/COX-2 сигнальний шлях [69].

### 1.2.3. Будова, імунологічні властивості та функції інших антигенів *M. tuberculosis*

Найбільш вагомим кроком вперед стало розшифрування геному *M. tuberculosis* H37Rv в 1998 [6, 70]. Ці знання прискорили дослідження мікобактерій в таких напрямках, як біохімія і структура індивідуальних протеїнів, імунологія туберкульозу, мікробіологія, вивчення специфічних метаболічних шляхів мікобактерій в період інфікування, захоплення макрофагами і персистенція, що зробило великий внесок у створення протитуберкульозних препаратів і різних типів вакцин.

Геном мікобактерій містить близько 3989 генів, які кодують функціональні продукти, з яких лише 30% — з відомими функціями, а решту відносять до категорії «гіпотетичних» [71]. Більшість протенів *M. tuberculosis* H37Rv належать до  $\alpha/\beta$  класу, тобто таких, в доменах яких вторинна структура складається із  $\alpha$ -спіралей та  $\beta$ -структур, що чергуються вздовж кістяка протеїнової молекули: до того ж  $\beta$ -складки належать до паралельних (прикладом таких доменів є лейцин-збагачені повтори (LRR), які можна виявити в інгібіторах рибонуклеаз) [71]. Однією з перспектив вивчення протеому *M. tuberculosis* є те, що для менш ніж 10% продуктів експресії генів патогенної бактерії відома тривимірна структура, визначена

рентгеноструктурним аналізом або за допомогою ЯМР [72]. Тому дослідження протенів *M. tuberculosis*, велика частина яких залишається досі із невідомими функціями, є пріоритетним напрямком для з'ясування ролі цих макромолекул у розвитку інфекційного процесу у чутливих до збудника організмів.

Виявлено, що білок MPT51 має в своєму складі  $\alpha/\beta$ -гідролазний фолд, подібний до таких у антигенів Ag85( A, B, C), які активно секретуються мікобактеріями при культивуванні [73]. Вивчення окремих активних або каталітичних ділянок у бактеріальних антигенах є ключем до пошуку проти них терапевтичних препаратів. Тому повертаючись до MPT51, протеїну, який є структурним компонентом Ag85, було виявлено, що обидві родини протеїнів мають спільний естеразний домен, але в MPT51 він не виконує функції трансферази у метаболізмі миколових кислот [74]. Відомо багато антигенів *M. tuberculosis*, які задіяні в класичних загальних шляхах метаболізму клітини, проте характеризуються наявністю окремих структур чи ділянок (фолдів, доменів), які визначають нові функції тих чи інших протеїнів. Наприклад, ізоцитратліаза (фермент, що задіяний в гліоксилатному шунті) *M. tuberculosis* грає одну з ключових ролей в персистенції мікобактерій в макрофагах запалення і є потенційною мішенню для створення протитуберкульозних препаратів [75].

Відомо, що геном *M. tuberculosis* H37Rv на 65,3% відсотків складається із Г/Ц пар. Результатом такого розподілу Г/Ц пар є те, що функціональні продукти, які одержуються в процесі трансляції, часто виходять із GUG-ініціаторних кодонів (35%), на відміну від *Bacillus subtilis* (9%) або *Escherichia coli* (14%) [76]. Хоча, звичайно, AUG-ініціаторний кодон найбільш поширений і спільний старт-поінт для прокаріотичних і еукаріотичних організмів. Логічно було припустити, що при наявності великої кількості гуанінових і цитозинових нуклеотидів, під час біосинтезу білка синтезуються макромолекули, збагачені на такі амінокислоти, як Ala,

Gly, Pro, Arg та Trp. З цього випливає, що протеїни, утворення яких починається з A/T-збіднених кодонів, дефіцитні на Asn, Ile, Lys, Phe та Tyr [77].

Секреторні протеїни *M.tuberculosis* CFP-10 (culture filtrate protein) та ESAT-6 (early secreted antigenic target) відіграють важливу роль в патогенезі туберкульозу, головним чином при легеневій інфекції [78]. Було показано, що ці два протеїни є вірулентними факторами з цитотоксичним ефектом на макрофаги, легеневі епітеліоцити, дендритні клітини [79]. Для ESAT-6 цитотоксичний ефект було показано ще й на фібробластах і макрофагах, при інкубуванні цього протеїну з культурою спостерігалися ознаки виходу клітин на шлях апоптозу. Після нічної інкубації макрофагів THP-1 з ESAT-6 клітини були помічені флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) та анексином-V [80]. Транслокація фосфатидилсерину з внутрішньої на зовнішню сторону мембрани, після чого він зв'язується з анексином-V і є ознакою апоптичної клітини.

Дослідження рекомбінантних CFP-10/ESAT-6 на клітинній лінії WI-38 (клітини легневих фібробластів людини), інкубованих зі злитим протеїном за концентрації 12,5 мкМ упродовж 48 год показали, що частка клітин, які вижили, становила 62%, що свідчить про загибель WI-38 внаслідок цитотоксичних процесів [79].

Не менш цікавий інший злитий протеїн — Ag85B-ESAT-6 (гібрид H1), який підходить на роль перспективного кандидата при створенні субодиничних вакцин. Його молекулярна маса дорівнює 41,1 кДа, рІ — 4,0, кількість молекул Cys, які ймовірно стабілізують велику білкову химерну молекулу, дорівнює 3 [81]. Окрім того, відомо, що молекули з непарною кількістю молекул цистеїну схильні до утворення міжмолекулярних дисульфідних містків, наслідком чого є різноманітна кількість мультимерних агрегатів. Звичайно, для терапевтичних препаратів протеїнів утворення будь-яких типів агрегатів є небажаним процесом, адже це може відобразитися на зниженні активності ліків. Часто це призводить до повної втрати

ефективності протеїнового препарату, і, крім того, таке явище може викликати несумісні із здоров'ям імунні реакції. Але є випадки, коли непередбачуване утворення мультимерів дало позитивний результат. При вивченні олігомерного антигену *Yersenia pestis* F1 було показано формування ефективнішої імунної пам'яті, ніж при використанні мономерів [82].

Методами 2D-електрофорезу та мас-спектрометрії білків фільтрату клітин *M. bovis BCG Moreau* показано існування щонайменше 100 різних протеїнів, потенційно важливих для створення нових вакцин та діагностичних реагентів. Дослідження цього штаму BCG є потенційно важливим, бо даний тип вакцин складає 5% світового використання. Результати отриманих даних фізико-хімічних параметрів та біологічних функцій антигенів *M. bovis BCG Moreau* було порівняно з *M. bovis BCG Pasteur*. Показано, що близько 34% антигенів обох штамів відрізняються за молекулярною масою і/або за ізоелектричною точкою [83]. Також було виявлено, що близько 24% протеїнів характеризуються невизначеними функціями [84].

Інший представник CFPs Ag85B був ідентифікований у представника *M. bovis BCG Moreau* у надлишку порівняно з *M. bovis BCG Pasteur*. Цей антиген залучений у біосинтез та розщеплення жирних кислот, так як представники Antigen-85 комплексу (FbpA, FbpB, FbpC, FbpD) є необхідними для синтезу миколових кислот [81]. Цей протеїн створює частковий захист проти туберкульозу, що було показано на тваринних моделях і що говорить про важливу імунодомінантну роль антигену як привабливого кандидата у створенні вакцин нового покоління [85].

Експресія протеїнів родини MPT (MPT70 і MPT83) у *M. bovis BCG Pasteur* має низький рівень, що пояснюється точковою мутацією старт-кодона у гені SigK, яка виявляється у багатьох типах BCG, але не у *M. bovis BCG Moreau* [83]. Цікавим виявилось і те, що лише останній штам здатний до експресії MPT64, яскраво вираженого імуногену, що є потенційною мішенню

для розробки нових вакцин [86]. Але якщо казати загалом, то склад CFPs у представників BCG має значну гомологію у будові та функціях.

Дуже цікавим виявилось і те, що у представника *M. microti* виявили відсутні кластери генів, відповідальних за експресію ESAT-6-подібних антигенів та PE і PPE-протеїнів — родини протеїнів, що містять мотиви (пролін(P) і глутамат(E) і пролін(P)-пролін(P)-глутамат(E) відповідно) на N-кінці макромолекул. Так як раніше *M. microti* використовували як живий компонент для вакцин проти туберкульозу у людей і ВРХ, це давало припущення про надзвичайну роль цих сімейств протеїнів у розвитку патогенезу мікобактеріальної інфекції [87]. Проте, як виявилось, *M. microti* був виявлений як такий, що викликає туберкульоз легень як у імунокомпетентних так і в компромісних до захворювання людей [88].

Як вже згадувалось про родини PE та PPE-протеїнів, геном *M. tuberculosis* H37Rv має однойменні групи генів, що кодують ці гліцин-збагачені продукти. Геном H37Rv кодує 99 представників PE та 68 представників PPE-протеїнів. Локалізація в клітині і біологічні функції цих молекул невідомі, але повідомляється, що, наприклад, 39-кДа протеїн родини PPE викликає сильну проліферацію Т-клітин та IFN- $\gamma$  імунну відповідь у мононуклеарах периферичної крові у PPD-позитивних індивідів [89].

Імунна відповідь клітин Th1 типу є необхідною для захисту від патогенних мікобактерій, таких як *M. tuberculosis* і *M. bovis* [1]. Дані, отримані у людей і на тваринних моделях показали, що Th1-клітинна відповідь підсилена продукцією IFN- $\gamma$  сприяє розвитку захисного імунітету проти туберкульозу. Таким чином підвищення рівня імунної відповіді Th1 клітин або збільшення титрів IFN- $\gamma$  у крові означатиме утворення стійкого імунітету до мікобактеріальної інфекції, що можна досягти внаслідок надлишкової експресії імунодомінантних антигенів у складі вакцини BCG, що і приведе до вищезгаданих ефектів [86]. Одним з таких протеїнів є антиген, що секретується в значній кількості Ag85B [90].

В-Л. Wang та іншими [91] було продемонстровано, що рівень сироваткових IgM та IgG в крові пацієнтів, імунізованих BCG, та у хворих на туберкульоз був значно вищий, ніж у здорових пацієнтів та тих, хто володів PPD- статусом (негативний результат на туберкулінову шкірну пробу). Рівень IgM проти мультиантигенного комплексу, що включав ESAT-6, CFP-21, MPT63 і MPT64 (96,2%) був більший, ніж при вимірюванні рівнів антитіл при окремому антигену, рівень яких склав 60, 3% 34,6%, 52,6% та 78,2% відповідно до вищеперахованих антигенів. А от щодо IgG, то рівень до MPT63 характеризувався значно вищим проти окремого компонента (93,6%), ніж при мультиантигенному комплексі (84,6%) [91].

Протеїни *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83 є молекулами з невизначеною функцією. Згідно із літературними даними про їх структуру та локалізацію, вони можуть бути задіяні у молекулярних взаємодіях між патогеном та імунними клітинами організму людини і тварин.

### 1.3. Підходи до розробки альтернативних діагностиків туберкульозу легень

#### 1.3.1. Існуючі діагностичні методи обстеження хворих при туберкульозі

На сьогодні день існує велике різноманіття серед діагностичних методів, які дозволяють підтвердити виставлений на підставі клініко-рентгенологічних даних діагноз туберкульозу легень, проте кожний має суттєві обмеження або вже є доволі застарілими.

*Шкірні тести з використанням туберкулінодіагностики.* Туберкулін, або PPD (Purified Protein Derivative), – екстракт, отриманий з *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* або *M. avium*. [92] PPD-S, прийнятий раніше за міжнародний стандарт, був отриманий в 1934 р. F.B. Seibert. PPD-L, який був

отриманий М. А. Линниковою в 1939 р. та використовується донині, – є сумішшю фільтратів убитих нагріванням культур мікобактерій туберкульозу людини (*M. tuberculosis*) і бика (*M. bovis*), які очищені від білкових домішок живильного середовища, осаджені трихлороцтовою кислотою, оброблені етиловим спиртом і ефіром для наркозу, розчинені в фосфатно-буферному розчині з твіном-80 в якості стабілізатора та фенолом в якості консерванта. Містить близько 200 антигенів, що зустрічаються не тільки у *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, але і у багатьох атипових мікобактерій.

Внутрішкірна проба Манту заснована на оцінці величини реакції гіперчутливості уповільненого типу (через 48-72 год) за участю Т-лімфоцитарної ланки системи імунітету, що розвинулася на тлі зараження організму вірулентними мікобактеріями туберкульозу або вакцинації BCG. Місцева шкірна реакція обумовлена взаємодією туберкуліну і фіксованих на лімфоцитах і мононуклеарах антитіл. У зв'язку з розширенням капілярів, дренажом тканинної рідини, скупченням нейтрофілів і моноцитів утворюється інфільтрат (папула), величину якої і вимірюють. Проте цей метод характеризується відсутністю стандартизації, слабкою чутливістю та специфічністю, наявністю псевдонегативних та псевдопозитивних результатів через імунодефіцити різного генезу, алергічні реакції, аутоімунні захворювання тощо.

*Мікробіологічні методи.* Посів мокротиння (або іншого матеріалу) на живильні середовища є найбільш достовірним серед всіх методів (якщо хворий з мокротинням виділяє мікобактерії, що спостерігається до 60 % хворих), але тривалим (від 2 тижнів до 2 місяців) [93, 94].

*Бактеріоскопічні* – з мікроскопічним дослідженням мокротиння (або іншого матеріалу) на кислотостійкі бактерії, – дешевий та швидкий, але суб'єктивний та трудомісткий тест; його удосконалення пов'язано із застосуванням флуоресцентних барвників та відповідних мікроскопів з автоматизацією обліку.

*Молекулярно-генетичні.* ПЛР для виявлення ДНК *M. tuberculosis* в мокротинні (або іншому матеріалі) дозволяє швидко одержати результат (протягом 1 доби), але постановка цього тесту є кошовною, потребує висококваліфікованих спеціалістів та витримування достатньо жорстких технологічних умов постановки; ці тести є менш чутливими, ніж мікробіологічні, але більш ефективними, ніж мікроскопія [95].

*Імунологічні тести* базуються, наприклад, на виявленні антитіл до мікобактерій або до їх окремих антигенів в рідинах організму. Недоліком таких тестів є те, що рівень специфічних антитіл в крові не завжди корелює з тяжкістю туберкульозного процесу (оскільки може бути низьким при дуже важких туберкульозних ураженнях), є неінформативним при імуносупресії будь-якого генезу, СНІДі (при цих станах показники тесту частіше в нормальних межах). Вияляти можуть або окремі класи імуноглобулінів або сумарні імуноглобуліни (G, A, M класу). Чутливість методів на основі ІЕА або РПГА коливається в межах 50-70%, а специфічність – близько 90%. Відносно невисока чутливість методу може дещо розчарувувати практикуючих лікарів та дослідників [96-98]. Незважаючи на це, враховуючи багатогранний і непередбачуваний характер туберкульозної інфекції, різнобічність та комплексність імунної відповіді, відсутність домінуючих біомаркерів у туберкульозної бацили, дослідження в напрямку вдосконалення серологічної діагностики захворювання продовжуються. Ці дослідження дали змогу виявити велику кількість потенційних маркерів в сироватці крові хворих [99-101].

Ще одним методом діагностики туберкульозу є оцінка реакції імунних клітин на мікобактеріальні антигени. Серед них виділяють реакції бласт-трансформації лімфоцитів з туберкуліном, реакція інгібування міграції лейкоцитів, інтерфероновий тест, Т-спот тест тощо. Такі тести характеризуються більшою чутливістю і специфічністю, оскільки оцінюють специфічну клітинну сенсibiliзацію, яка часто корелює з тяжкістю процесу,

проте поступаються вартістю проведення, тривалістю постановки, суб'єктивністю підрахунку клітин тощо.

### 1.3.2. Удосконалення компонентів імуноензимних тест-систем для серологічної діагностики туберкульозу

Загалом в Україні щорічно фіксується близько 30 тис. нових випадків інфікування туберкульозом [3]. Проте, за статисти стичними даними, лише у Києві за рік звертаються до лікувально-профілактичних закладів з симптомами затяжного кашлю (хронічний бронхіт, пневмонія тощо) приблизно 300 тис. хворих. Всі вони потребують обстеження щодо можливого інфікування збудником туберкульозу. Використання в якості допоміжного методу діагностики скринінгової тест-системи дозволило б суттєво підвищити ефективність діагностування туберкульозу.

Тривалий час інфікована туберкульозом особа може не знати свого діагнозу, внаслідок чого лікування не розпочинається вчасно, а хворий чи носій стає джерелом інфекції, сприяючи поширенню хвороби. Тому розробка та впровадження ефективних методів діагностики туберкульозу є одним з основних напрямків боротьби з цією хворобою.

Серологічні тести завдяки своїй відносно невисокій вартості, швидкості, достатньо високій чутливості та специфічності можуть скласти конкуренцію шкіряній пробі при масових обстеженнях поголів'я корів або населення[102].

Одним з підходів, що дозволяє підвищити чутливість тест-систем, є використання антигенних композицій, які складаються з декількох імунодомінантних антигенів. Проте, це створює серйозні технологічні труднощі: необхідно або тестувати зразок сироватки на специфічність до кожного з антигенів у незалежних тестах (при цьому зростає собівартість аналізу), або ж як антиген наносити суміш протеїнів, що ускладнює

стандартизацію та відтворюваність методу. Найбільш ефективним способом вирішення цього завдання є об'єднання послідовностей відповідних антигенів у єдиний химерний протеїн через злиття фрагментів їх ДНК в одній рамці зчитування. В даній роботі пропонується використати в якості антигену химерний протеїн, що містить послідовності імунодомінантних протеїнів *Mycobacterium spp.* MPT63 та MPT83. Це дозволить спростити процедуру виробництва антигенної субстанції та ефективно контролювати співвідношення епітопів у складі імуносорбенту для проведення імуноензимного аналізу, і, відповідно, знизити собівартість тест-системи та підвищити точність діагностики.

Генні елементи при створення конструкції для експресії химерного протеїну були обрані на підставі аналізу даних літератури. Ген *mpb63* присутній лише в геномах *Mycobacterium spp.*, що відносяться до туберкульозного комплексу (група близькоспоріднених видів мікобактерій, з високим ступенем гомології та ідентичністю 16S рРНК, здатних викликати туберкульоз у людини і тварин), але відсутній у *M. avium*, а в геномі *M. leprae* присутній псевдоген *mpt63*, який не транскрибується [103-104]. Крім того, MPB63 – секреторний протеїн мікобактерій [105, 106], синтезується у великій кількості та є високо імуногенним. MPB83 характерний лише для мікобактерій туберкульозного комплексу і є гомологом секреторного білка мікобактерій MPB70 [107]. Відомо, що у хворих на туберкульоз корів антитіла проти MPB83 починають утворюватися на ранній стадії захворювання [108]. Доцільність використання даних антигенів для діагностики підтверджують також і наші попередні дослідження [109].

*M.intracellulare* та *M.fortuitum* – широко розповсюджені види *Mycobacterium* [110]. Ці штами викликають захворювання переважно у тварин чи пацієнтів, що характеризуються імунодефіцитними станами. Згідно філогенетичного аналізу, вищезгадані представники разом з *M.bovis* та *M.tuberculosis* характеризуються наявністю спільних антигенів, тому

сенсibilізація атипovими мікобактеріями заважає діагностиці, заснованій на використанні гетерогенних сумішей антигенів, наприклад туберкуліну.

Антигенні складові химерного протеїну МРТ83(115-220)-МРТ63 та злитого протеїну на основі повнорозмірного МРТ83 ідентифіковані у представників *M.bovis/M.tuberculosis*, що забезпечило специфічність тест-системи для діагностики *Mycobacterium tuberculosis complex* у ВРХ та у людей. Окрім того, відсутність перехресних генних ділянок цих протеїнів у *M.bovis/M.tuberculosis* у порівнянні з іншими видами мікобактерій, виключає «хибнопозитивні» результати. Отже, дослідження наявності антитіл у тварин, заражених нетуберкульозними мікобактеріями (NTM) - невід'ємний етап дослідження антигенної композиції для визначення можливості її використання як компонента тест-системи для діагностики туберкульозу.

Наявність реакції гіперчутливості сповільненого типу у корів на туберкулін для птахів [111] підтверджує раціональність використання серологічних методів на основі ІЕА для спростування хибно позитивних реакцій. Можливий контакт тварин з птахами, зараженими *M.avium*, може відобразитися на імунному статусі тварини, коли проявляється шкірна реакція як на туберкулін птиці, так і на туберкулін корів, але тварина при цьому не хворіє на туберкульоз. Хибнопозитивні результати шкіряної проби, які виникають внаслідок цього, негативно впливають на економічне становище фермерських господарств, що проявляється у заборі здорової тварини та втраті вкладених у неї коштів.

Раніше було перевірено злитий протеїн МРВ83(115-220)-МРВ63 на реакцію щодо сироваток тварин [169], що були імунізовані вакцинним штамом *M.bovis BCG*. Саме ця вакцина є причиною хибнопозитивних результатів при шкірній пробі у людей. Але при тестуванні злитого антигену зразки сироваток від даних тварин давали негативну відповідь, що лише доводить ефективність та доцільність використання серологічних методів з використанням окремих антигенів мікобактерій.

Таким чином, серед перелічених діагностичних тестів більш сучасні тести є високочутливими та високо специфічними, але є коштовними й не завжди доступними в умовах слабких економік з поширеним серед населення туберкульозом легень.

Тому не втрачає актуальності розробка тест-систем, які дозволяють виявляти в крові антитіла до *M. tuberculosis complex* або їх окремих найбільш імуногенних антигенів, на підставі використання окремих рекомбінантних антигенів, що дозволяє стандартизувати реакції. Такі тести є відносно не коштовними, зручні у практичному використанні, дозволяють швидко (протягом годин) одержувати результат.

Отже, аналіз літературних даних засвідчив, що розробка нових діагностичних тестів на основі імунодомінантних антигенів *Mycobacterium* МРТ63 та МРТ83, є актуальним завданням сучасної медицини та ветеринарії. Розширення знань про імунобіологічні властивості рекомбінантних антигенів МРТ63 та МРТ83 та їх використання для створення імуноензимних тест-систем стало метою даної дисертаційної роботи.

## РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Матеріали

#### 2.1.1. Реактиви

Експериментальні дослідження проводили в лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

У роботі були використані: середовища для бактерій LB (Helicon, Росія), 2YT («Sigma», США), бактеріологічні петлі, чашки Петрі, агар (Helicon, Росія), агароза («Sigma», США), IPTG (Thermo Scientific), Ni<sup>2+</sup>-NTA агароза (Qiagen, Німеччина), персульфат амонію, тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), акриламід, N, N' – метилен-біс-акриламід, β-меркаптоетанол, трицин («Sigma-Aldrich», США), додецилсульфат натрію (ДСН) («Sigma-Aldrich», США), BSA, сечовина, бром феноловий синій, кумасі блакитний G-250, імідазол, трис(гідроксиметил)амінометан (Tris) («Sigma-Aldrich», США), люмінол, нітроцелюлоза («Amersham Biosciences», США), 3,3' – діаманобензидин тертрагідрохлорид (DAB), 3,3',5,5'- тетрамethylбензидин (ТМБ), повний та неповний ад'юванти Фрейнда (Sigma, США), гліцерин, етиловий спирт, метиловий спирт, оцтова кислота, диметилсульфоксид (ДМСО), етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, CaCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub> (Міранда-С, Україна), хлорамфенікол, ампіцилін, канаміцин, глюкоза (Київмедпрепарат, Україна), параформальдегід, Mowiol-DABCO (1,4-діазабіцикло[2, 2, 2]октан), Triton X-100 («Sigma-Aldrich», США), Tween 20 (Helicon, Росія), трипановий синій, барвник для контрастування ядер Hoechst 33342, пропідій йодид, TRI-реагент для виділення тотальної РНК («Sigma-Aldrich», США), РНК-аза А, ДНК-аза, M-MuLV зворотна транскриптаза, оліго d(T)-праймери, RiboBlock RNase інгібітор, *Taq*- та *AccuTaq* LA ДНК полімерази, дезоксирибонуклеотидтрифосфати (dNTPs), ендонуклеази рестрикції, T4

ДНК лігаза (Thermo Scientific), маркери для електрофорезу протеїнів та нуклеїнових кислот, коктейль інгібіторів протеїназ (prod #1861279, Thermo Scientific), набір для виділення ДНК (GeneJET PCR Purification Kit (#K0702), GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0503) (Thermo Scientific), моноклональні антитіла до ERK1/2 (Santa Cruz Biotech, США), p65 NF-κB (Thermo Scientific), флуорофор-мічені антитіла до CD11b, F4/80 (Thermo Scientific), CD3, HLA-DR, CD13, CD16, CD33, CD45RA (Beckman Coulter, США), культуральні флакони та чашки для культури тканин (Greiner Bio One, Німеччина), середовище RPMI-1640 з L-глутаміном та індикатором, фетальна бичача сироватка (ФБС), пеніцилін, стрептоміцин, амфотеріцин, МТТ (3-(4,5-діметилтіазоліл-2)-2,5-діфенілтетразоліум бромід), одноразовий лабораторний посуд (Delta Lab, Іспанія) та інші реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а.

### **2.1.2. Обладнання**

Камера для вертикального електрофорезу (Bio-Rad, США), камера для горизонтального електрофорезу (Helicon, Росія), орбітальний шейкер-термостат ES-20, CO<sub>2</sub>-інкубатор, ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, Німеччина), прилад для електропорації Electroporator 2510 (Eppendorf, Німеччина), спектрофотометр GeneQuantoPro (Amersham Biosciences, США), спектрофлуориметр QuantaMaster 400 (Photon Technology International, Канада), шафа-ламінар (Holten, Франція), мультилункові рідери μQuant ELx800 (BioTek, США), рН-метр CyberScan 510 (Eutech Instruments, Сінгапур), мікроцентрифуга А-14 (Joan, Франція), охолоджувач SC-2М та нагрівач зразків TDD-120 (Biosan, Латвія), холодильно-опалювальна установка (рефрижератор) (Joan, Франція), аналітичні ваги WAA 210/C/1 (Salex, Данія), конфокальний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина), протоковий цитофлуориметр Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США).

### 2.1.3. Лабораторні тварини, культури клітин еукаріот, експресійні штами бактерій та вектори

В експериментах було використано мишей (3-4 міс. самки мишей лінії BALB/c, масою 35-40 г, n=70) та наступні клітинні лінії еукаріот та штами *E.coli*: U937, моноцитарні клітини лімфоми людини, які були ізольовані з гістіоцитарної лімфоми і використовуються для вивчення диференціації моноцитів, A431 - клітинна лінія епітеліального походження, виділена з хворої на аденокарциному людини, KG-1, клітин мієлоїдної лейкемії людини, 3T3, клітинна лінія фібробластів, виділена з ембріональної тканини миші, J774, клітини макрофагального фенотипу, одержані з мишей BALB/c, U2149, гетерогенна лінія охарактеризована Genberg та співавторами в 1989р. [29], зокрема ними було показано, що вона включає як макрофаго- так і фібробластоподібні клітини людини, X63, клітинна лінія отримана з плазмацитоми або лімфобластоми В-клітин мишей. Більшість модельних клітин були отримані з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України.

Бактеріальні клітини *E.coli* штамів BL21 (DE3) Rosetta та DH10B (Novagen, США). Плазмідні вектори для експресії протеїнів в прокаріотичній системі експресії pET-24a(+) та pET-28a(+) (Novagen, США). Для конструювання флуоресцентних похідних MPT63 та MPT83 з mCherry було використано генетичний вектор pmCherry (Clontech, США), що був люб'язно наданий професором Danielle E. Johnson [112].

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.

#### 2.1.4. Програмне забезпечення

Аналіз електрофореграм – TotalLab Quant, зображень з конфокального мікроскопу – FIIJ, обробка даних з протокового цитофлуориметра – FCS Express v3.0. Створення і упорядковування рисунків – Adobe Photoshop CS5 2014 та CorelDraw 2018. Оформлення дисертаційної роботи – Microsoft Word згідно правил та рекомендацій наказу №40 від 12.01.2017 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій» [113].

### 2.2. Методи

#### 2.2.1. Створення генетичної конструкції, що кодує повнорозмірний антиген *M.tuberculosis* MPT83

Фрагмент гена *mpt83* (повнорозмірного) ампліфікували ПЛР з вакцинного штаму *Mycobacterium bovis* BCG-Russia (Росія) 2-ма олігонуклеотидами: MPT83 L SP 5'TGGATCCAGCACCAAAACCCGTGTCGCA3' та MPT83 L ASP 5'AATCTCGAGCTGTGCCGGGGGCATCAGCA3'. Ампліфікацію необхідної послідовності проводили з використанням *Taq*-полімерази за наступних умов: інкубація при 94° С протягом 3 хв; цикл: денатурація при 94° С протягом 30 с, випал при 55° С протягом 30 с і елонгація при 72° С протягом 1 хв; 28 циклів; фінальна елонгація – 72° С протягом 7 хв. Продукти ПЛР були екстраговані з агарозного гелю та очищені за допомогою набору GeneJET Gel Purification Kit (Thermo Scientific). Плазмідна ДНК була отримана з використанням комплекту з GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermof Scientific). Всі маніпуляції виконувалися відповідно до інструкцій виробника. Ампліфікований (повний) ген *mpt83* зшивали з експресійним вектором *E. coli* pET24a (+) (Novagen, Німеччина) за сайтами рестрикції *Bam*HI та *Xho*I. Отриману конструкцію використовували для трансформації *E.coli* штаму Rosetta (DE3) (Novagen,

Німеччина) для експресії протеїнів. Кілька клонів, верифікованих за допомогою ПЛР та рестрикційного аналізу, були заморожені.

### 2.2.2. Створення генетичних конструкцій, що кодують флуоресцентні похідні MPT63 та MPT83, злитих з червоним флуоресцентним протеїном mCherry

Ген *mcherry* був ампліфікований з плазмідної ДНК *pmCherry* за допомогою пари праймерів *mCherry-ASP* 5'CAGGAATTCGATTTGTACAGCTGTCCATGCC3' та *mCherry-SP* 5'GAAGGATCCACCATGGTGAGCAAGGG3'. Продукт ампліфікації був вбудований в плазмиду *pET28a* за сайтами для ендонуклеаз рестрикції *Bam*HI та *Eco*RI. ДНК-послідовності MPT83 та MPT63 ампліфікували з плазмідної ДНК *pET24a* із вбудованими послідовностями *mpt63* та *mpt83* за допомогою пари праймерів, що добудовують сайти для ендонуклеаз рестрикції *Eco*RI та *Xho*I (*mpt83-SP* 5'TAGAATTCAAACCCGTGTCGCAAG3' та *mpt83-ASP* 5'CTACTCGAGCTACTGTGCCGGGGGCATCAGCA3' для *mpt83*, і для *mpt63* – *mpt63-SP* 5'TAGAATTCGCTCACCACAATGATCAAGA3' та *mpt63-ASP* 5'CTACTCGAGCTACGGTCCCAAATCAGCAGAT3'). Параметри проведення ПЛР: інкубація при 94° С протягом 3 хв; цикл: денатурація при 94° С протягом 40 с, випал при 55° С протягом 30 с і елонгація при 72° С протягом 50 с; 25 циклів; фінальна елонгація – 72° С протягом 7 хв. Отримані ПЛР-продукти та ДНК отриманого вектору *pET28a-mCherry* обробляли ендонуклеазами рестрикції *Eco*RI та *Xho*I. Фрагменти вектору *pET28a-mCherry* та ДНК-послідовності *mpt63* та *mpt83* змішували у молярному співвідношенні 1:3, та об'єднували за допомогою Т4 ДНК лігази. Отриманими лігазними сумішами із сконструйованими плазмідами *pET28a-mCherry-mpt63* та *pET28a-mCherry-mpt83* трансформували клітини штаму *E. coli* Rosetta.

### 2.2.3. Удосконалення генетичної конструкції, що кодує рекомбінантний злитий протеїн МРТ83-МРТ63

ДНК-послідовність повнорозмірного розчинного білка МРТ83 ампліфікували з плазмідної ДНК *pET24a-mpt83* за допомогою праймерів, що добудовують сайти для ендонуклеаз рестрикції *EcoRI* та *BamHI* - *mpt83-SP* 5'TGGATCCAGCACCAAACCCGTGTCGCA3' та *mpt83-ASP* 5'TAGAATTCTGTGCCGGGGGC3'. Продукт ампліфікації був вбудований в плазмідну ДНК *pET28a* за відповідними сайтами для ендонуклеаз рестрикції. Ген *mpt63* був ампліфікований з плазмідної ДНК *pET24a-mpt63* за допомогою пари праймерів *mpt63-ASP* TCAGCTCGAGCGGCTCCCAAATCAGCAGA та *mpt63-SP* ACAAGCTTTTGCTCACCAATGATCAAGACGGC. Отриманий ПЛР-продукт був заклонований в плазмідну ДНК *pUC-19* по затупленим кінцям. Після рестрикційного аналізу коректну вставку *mpt63* та ДНК отриманого вектору *pET28a-mpt83* обробляли ендонуклеазами рестрикції *XhoI* та *HindIII*. Отримані фрагменти вектору *pET28a-mpt83* та ДНК-послідовність *mpt63* змішували у молярному співвідношенні 1:3, та об'єднували за допомогою Т4 ДНК лігази. Отриманою лігазною сумішшю із сконструйованою плазмідною ДНК *pET28a-mpt83-mpt63* трансформували клітини штаму *E. coli* Rosetta.

### 2.2.4. Електрофоретичне розділення ДНК в поліакриламідному та агарозному гелях

Розділення нуклеїнових кислот з метою використання в наступних молекулярно-біологічних маніпуляціях проводили в 1% агарозному гелі (Sigma, США) в ТАЕ-буфері (Трис-ацетат-ЕДТА, Sigma, США) або в 8% акриламідному гелі в ТВЕ-буфері (трис-борат-ЕДТА). Фрагменти ДНК різної довжини візуалізували з використанням 0,01% бромистого етидію в ультрафіолеті ( $\lambda = 312-365$  нм).

### 2.2.5. Електрофоретичне розділення протеїнів у ДСН-ПААГ

Електрофоретичне розділення протеїнів у ДСН-ПААГ (за Лемлі) проводили за модифікованою методикою з додаванням 0,1 М трицину до катодного буферного розчину [114]. Протеїнові препарати *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83 в буфері для зразків (6 М сечовина, 4% ДСН, 5%  $\beta$ -меркаптоетанол, 20% гліцерин, бромфеноловий синій) були прогріті до 85° С 5 хв перед нанесенням. Розділення протеїнів проводили в 10% ДСН-ПААГ електрофорезі. Як електродні буфери використовували анодний буфер (0,2 М Tris, рН 8,9) та катодний (0,1 М трицин, 0,1 М Tris, 0,1% ДСН). Для ідентифікації протеїнів гель забарвлювався у розчині кумасі блакитного G-250.

### 2.2.6. Трансформація клітин *E.coli* та селекція позитивних клонів, що експресують рекомбінантні антигени

Приготування компетентних клітин є важливим етапом для трансформації клітин розробленими конструктами. «Компетентність» — в даному випадку означає здатність клітин поглинати з розчину чужорідну ДНК.

Культуру бактеріальних клітин нарощували до оптичної щільності  $A_{600}=0,5-1$ , центрифугували 15 хв при 3600 об/хв, осад клітин промивали двічі деонізованою водою і ресуспендували в 10% гліцерині.

Одержаними експресійними векторами *pET24a-MPT83*, *pET28a-mCherry-MPT63*, *pET28a-mCherry-MPT83* та *pET28a-MPT83-MPT63* шляхом електропорації було трансформовано бактерії *E.coli* штамів BL21 Rosetta (DE3) або DH10B. Отримані бактерії висівали на чашки Петрі з агаризованим (1,5%) поживним середовищем LB та селективним антибіотиком канаміцином (50 мкг/мл). Колонії, що виростили на такому поживному

середовищі вважали позитивними. Наступну верифікацію колоній із клонованими ДНК послідовностями цільових генів проводили за допомогою ПЛР.

### **2.2.7. Індукція експресії рекомбінантних антигенів в прокаріотичній системі експресії *E.coli***

Клітини продуцентів нарощували в поживному середовищі LB (10 г/л бакто-триптон, 5 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л NaCl) що містило 50 мкг/мл канаміцину та глюкозу до кінцевої концентрації 1%, до оптичної густини, що відповідає  $A_{600}=0,3-0,5$ . Після цього додавали індуктор експресії IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, ізопропіл- $\beta$ -D-тіогалактозид) до кінцевої концентрації 1 мМ, і залишали на 3,5-4 год при активній аерації і температурі 30° С. Потім клітини осаджували центрифугуванням, надосадову рідину видаляли, а осад клітин використовували для виділення цільових протеїнів.

### **2.2.8. Виділення та очищення рекомбінантних протеїнів методом метал-афінної хроматографії**

Досліджувані рекомбінантні протеїни продукуються злитими з полігістидиновим тагом (маркерна послідовність, яка кодується плаз мідною ДНК *pET28a*), що дозволяє виділяти його методом метал-афінної хроматографії на сорбенті Ni-NTA агароза.

Осад клітин, що експресували протеїни MPT83-MPT63, MPT63. mCherry та флуоресцентні похідні мікобактеріальних антигенів mCherry-MPT83 та mCherry-MPT63 ресуспендували у буфері для відмивання (50 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (рН 8,0), 0,5 М NaCl), що містив 6М сечовину, обробляли ультразвуковим дезінтегратором Labsonic („Sartorius”, ФРН) та осаджували клітинний «дебріс» 20 хв. за 13000 об./хв. Надосадову рідину наносили на

колонку, попередньо врівноважену буфером для відмивання з 6М сечовиною. Колонку промивали 10-15-ма об'ємами буфера для відмивання, що містив 6М сечовину. Після цього колонку послідовно промивали 4-ма об'ємами буферу з 4М сечовиною, 2М сечовиною, 1М сечовиною і, врешті, 10-ма об'ємами буферу для відмивання без сечовини (50 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (рН 8,0), 0,5М  $\text{NaCl}$ ). Також, щоб позбутися протеїнів, які не мають тег, але містять чисельні гістидинові амінокислотні залишки, колонку промивали буфером для відмивання з імідазолом з фінальною концентрацією 10 мМ. Цільові протеїнові препарати елюювали буфером для відмивання, що містив імідазол до кінцевої концентрації 250 мМ (але не містив сечовину), після чого діалізували проти ЗФР (0,8%  $\text{NaCl}$ , 0,02%  $\text{KCl}$ , 0,144%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,024%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,4). Виділення протеїнів проводили за температури 4° С.

Клітини, які продукували мікобактеріальний антиген МРТ83, після ультразвукової обробки, дії лізоциму і ДНКаз та центрифугування наносили на попередньо врівноважену колонку ЗФР без сечовини, промивали та елюювали буфером, що містив 250 мМ імідазол, але не містив денатуруючі агентів. Отримані фракції антигенів аналізували електрофорезом у 10% ПААГ.

### **2.2.9. Вестерн-блот аналіз та хемілюмінесцентний аналіз**

Перенесення протеїнових фракцій на нітроцелюлозу («Amersham BioSciences», США) здійснювали за допомогою електроблотера у буферному розчині для перенесення (25 мМ  $\text{Tris-HCl}$ , 0,1% ДСН, 20% метанолу, 192 мМ гліцину). Після перенесення мембрану витримували у 5% розчині знежиреного молока у ЗФР протягом 1 год при 37° С. При класичному імуноблот аналізі, щоб ідентифікувати 6His таг мічені протеїни, мембрану після промивання у ЗФР витримували 1 год при 37° С з анти-polyHis таг антитілами (1:3000) кон'югованими з ПХ. Проявлення нітроцелюлозної мембрани здійснювали протягом кількох хвилин у розчині для візуалізації,

що містив 0,07% ДАБ та 0,035%  $H_2O_2$  в ЗФР. Для визначення змін активності MAP кіназ та ядерних факторів мембрану після промивання у ЗФР витримували протягом ночі при  $4^\circ C$  у розчині моноклональних антитіл проти фосфорильованої форми кінази ERK1/2 (#4370, Cell signaling technology, USA) у розведенні 1:2000 в ЗФР з додаванням 0,04% Tween 20 та 5% сироваткового альбуміну бика (БСА) або проти НК-кВ p105 («Sigma», США) у розведенні 1:1000 в ЗФР з додаванням 0,04% Tween 20 та 5% знежиреного молока. Після цього мембрану промивали ЗФР з додаванням 0,04% Tween 20 при перемішуванні протягом години та тричі міняли буфер. Потім мембрану витримували у розчині анти-кролячих антитіл кон'югованих з ПХ у розведенні 1:10000 в ЗФР з додаванням 0,04% Tween 20 та 5% знежиреного молока протягом 1 год при  $37^\circ C$  і слабкому перемішуванні. Після закінчення інкубації нітроцелюлозну мембрану знову ретельно промивали, як описано вище.

Проявлення нітроцелюлозної мембрани здійснювали у розчині 100 мМ Tris-HCl, що містив 0,025% люмінолу, 0,003% кумарової кислоти та 0,035%  $H_2O_2$ , який вносили безпосередньо перед проявленням. Люмінісценцію фіксували на рентгенівській плівці.

#### **2.2.10. Ковалентне мічення протеїнів флуорофором FITC**

Проводили діаліз очищених рекомбінантних антигенів *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83 проти карбонатного буферного розчину (0,16 М  $Na_2CO_3$ , 0,33 М  $NaHCO_3$ , рН 9,5) протягом доби з однією зміною буферу. За необхідності протеїни концентрували за допомогою 10 kDa концентратора (Pierce) до кінцевої концентрації близько 1 мг/мл. Концентрацію протеїну перевіряли денситометрично. Підготовані розчини протеїну змішували з розчином FITC в DMSO (1 мг/мл) в молярному співвідношенні протеїн/FITC 1 : 5 та інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі без доступу

світла. Після цього кон'югат діалізували проти буфера 1 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,5; після діалізу додавали  $\text{NaN}_3$  до фінальної концентрації 0,1%.

### **2.2.11. Одержання часток на основі фосфату кальцію та іммобілізація на них рекомбінантних антигенів *M.tuberculosis***

Метод синтезу наночасток фосфату кальцію базується на принципі утворення нерозчинних часток фосфату кальцію при змішуванні розчину солей кальцію та фосфату у присутності цитрату натрію. Для синтезу наночасток на основі фосфату кальцію змішували розчини 12,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 12,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  та 15,6 mM цитрату Na у співвідношеннях 7,5:7,5:1,5. На 16,5 мл такої суміші додавали 400 мкл розчину білків (mCherry або MPT63) з концентрацією 0,5 мкг/мкл (200мкг). Причому всі вище згадані розчини для синтезу наночасток додавали по чергово у розчин білка (спочатку протеїн, потім цитрат натрію, далі фосфат натрію двозаміщений, а в кінці кальцій хлорид). Такий підхід дозволяв кон'югувати білок з наночастками. Отримані суміші перемішували на магнітній мішалці протягом 48 годин при 4°C. Далі розчин осаджували за 13 000 об/хв. протягом 30 сек., а потім відмивали та зберігали у ЗФР (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,024%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4).

За допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120 проводили розрахунки іммобілізації білків на кальцій-фосфатних наночастинках денситометричним методом. Для цього був проведений гель-електрофорез білка, іммобілізованого на частинках, проби попередньо були прогріті в денатуруючому буфері для проб (сечовина, меркаптоетанол) до 80° C протягом 25 хв. для кращої дисоціації антигенів від частинок неорганічного походження.

### 2.2.12. Зимографія

Активність матриксних металопротеїназ (ММП) визначали за допомогою електрофоретичного методу (зимографія, ензим-форез), що базується на деградації субстрату (наприклад, желатину) протеїназами клітин. Середовище клітин J774, які піддавались тригерній дії мікобактеріальними антигенами MPT63 та MPT83, концентрували в 7 разів (VivaSpin 500, Sartorius, Німеччина). Зразки готували з додаванням нативного буферу для проб (125 мМ Tris, 4% ДСН, 20% гліцерин, 0,01% бромфеноловий синій) у співвідношенні 1:1 для завантаження у гель без попереднього прогрівання. Кондиційоване середовище розділяли електрофоретично у 10% ДСН-ПААГ, в гелі з 0,125% желатином. Відновлення активності MMPs в поліакриламідному гелі проводили шляхом видалення з нього ДСН, за допомогою 2,5% Triton X-100 впродовж 30 хв при кімнатній температурі, тричі змінюючи буфер для відмивання. Далі гель інкубували протягом 18 год і 37° С при обережному струшуванні в Gelatinase digestion буфері (50 мМ Tris-HCl, 200 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH=7.6). Гель зафарбовували кумасі блакитним G-250 для ідентифікації смуг «виїдання», що репрезентують протеолітичну желатиназну активність. Молекулярні маси прозорих смуг визначали за маркерами молекулярної ваги.

### 2.2.13. Одержання первинної культури перитонеальних макрофагів миші

Вводили 5 мл стерильного фізіологічного розчину у ділянку перитонеальної порожнини мишей. Правильна ін'єкція фіз. розчином свідчить про рівномірне розбухання перитонеальної порожнини, а не її локальне потовщення. Протягом 1 хв живіт легенько масажували, щоб фіз. розчин вимив макрофаги. Ножицями розрізали невеличку ділянку шкіри, але не пошкоджували цілісність перитонеальної порожнини. За допомогою

шприца акуратно відбирали змив, та переносили його в чистий посуд. Рідину центрифугували 5 хв при 300 g, надосадову рідину відбирали, а осад клітин ресуспендували в 5 мл середовища RPMI-16 з L-глутаміном та 50 мг/л цефалотину та переносили на чашку Петрі. Після адгезії макрофагів до дна чашки, останню промивали ЗФР від середовища, сироватки та еритроцитів. Клітини знімали розчином 30 мМ ЕДТА в ЗФР протягом 15 хв при 37°C та активному перемішування.

#### **2.2.14. Культивування культур еукаріотичних клітин**

Клітини ліній *U937*, *J774*, *U2149*, *3T3*, *L929*, *A431*, *X63* культивували на поживному середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном, що містило 10 % фетальної сироватки ВРХ, стрептоміцин (100мг/л), пеніцилін (10 000 U) та амфотерицин В (250 мкг/л). Культуру клітин культивували в культуральних флаконах Grenier ("Sartorius", ФРН), в 5% атмосфері CO<sub>2</sub> при 37 °С.

#### **2.2.15. Визначення цитотоксичної/цитостатичної активності рекомбінантних протеїнів методом МТТ-тесту**

Колориметричний метод оцінки кількості живих клітин за активністю мітохондріальних дегідрогеназ виконували згідно [115, 116]. В лунки плоскодонного планшету вносять по 100 мкл суспензії клітин з концентрацією 20 000 кл./лунку в середовищі RPMI-1640 (з L-глутаміном, що містило антибіотики стрептоміцин (100 мг/л), пеніцилін (10 000 U/л) та амфотерицин В (250 мкг/л) з 10% ембріональною сироваткою телят. Клітини нарощували до конфлюентного стану у 96-лункових планшетах. Через 24 год. середовище змінювали на свіже, яке не містило ембріональну телячу сироватку. Розчини протеїнів, пропускали через фільтр, щоб уникнути бактеріальної або дріжджової контамінації у лунках, що може вплинути на неправильну інтерпретацію результатів експерименту. Контрольні речовини

вносили у концентраціях: ЛПС – 500 нг/мл, МРТ63, МРТ83 та mCherry – 10 мкг/мл). Планшет інкубували протягом 56 год, в термостаті при 37° С та 5% CO<sub>2</sub> в атмосфері. Після закінчення терміну інкубації, вміст лунок видаляли, а до клітин додавали МТТ-реактив до кінцевої концентрації 0,5 мг/мл та культивували за тих же умов протягом 4 год. Після фіксації клітинами реактиву та перетворення його в гранули формазану до клітин додавали по 100 мкл розчину 10% ДСН у диметилсульфоксиді, підкисленого 0,04 М НСІ, та інкубували протягом 15 хв за 37° С при активному перемішуванні. Після розчинення утворених кристалів формазану вимірюють оптичну густину зразків в лунках за допомогою мультилунокового спектрофотометра при довжині хвилі 570 нм (референтна довжина хвилі – 630 нм). Аналіз результатів проводили за показниками відносних одиниць ОГ – на основі порівняння контрольної і дослідних груп: якщо ОГ дослідних груп менша за ОГ контрольної, мова йде про цитотоксичний ефект антигенів у середовищі інкубації.

#### **2.2.16. Визначення пороутворюючих властивостей МРТ63 та МРТ83 методом спектрофлуориметрії**

Визначення здатності МРТ63 та МРТ83 до пороутворення на плазматичній мембрані проводили за реєстрацією змін у вмісті внутрішньоклітинного кальцію [Ca<sup>2+</sup>] з використанням зонду Fluo-4-AM як описано в [117]. Клітини U937 (2,5x10<sup>5</sup>/мл) було навантажено 2 мкМ Fluo-4-AM в середовищі RPMI-1640, що не містило індикатору фенолового червоного при 37°С протягом 30 хв. Після реакції де-естерифікації клітини були тричі відмиті в середовищі RPMI-1640 і ресуспендовані в ньому, концентрація кальцію в середовищі складала 500 мкМ. Швидке кінетичне вимірювання флуоресценції проводили з інтервалом 600 сек. Позитивним та негативним контролем служили Ca<sup>2+</sup> іонофор (іономіцин 1 мкМ) і 3 мМ

хелатуючий агент ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота). Реєстрацію змін цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  визначали за зміною флуоресценції у порівнянні з клітинами, які були у середовищі інкубації без антигенів чи пороутворювальних речовин.

### 2.2.17. Конструкція імунної фагової бібліотеки

Із тканини селезінки імунізованих МРТ63 або МРТ83 мишей за допомогою TRI Reagent (Sigma, США) виділяли загальну РНК, яку використовували як матрицю під час синтезу кДНК. Послідовності, що кодують варіабельні домени легкого та важкого імуноглобулінових ланцюгів ( $V_H$  та  $V_L$ ), ампліфікували за допомогою набору специфічних праймерів, для дизайну яких слугувала робота Okamoto та ін. [118]. Для ампліфікації використовували високоточну полімеразу AccuTaq LA DNA Polymerase («Sigma», США). Об'єднання нуклеотидних послідовностей  $V_H$  та  $V_L$  проводили методом ПЛР за добудованими послідовностями, що перекриваються (SOE-ПЛР). Одержані ДНК-послідовності scFv вбудовували у фагмідний вектор pCANTAB-5E за сайтами для ендонуклеаз рестрикції *SfiI* та *NotI*. Отриманою лігазною сумішшю трансформували компетентні клітини *E.coli* штаму XL1-blue методом електропорації.

### 2.2.18. Одержання фагових частинок

Клітини, трансформовані фагмідами з послідовностями МРТ63 та МРТ83 специфічних scFv, заражували фагом-хелпером M13K07 та інкубували упродовж ночі. Фагові частинки осаджували преципітацією з розчином PEG/NaCl (20% PEG-6000, 2,5 М NaCl) як описано раніше [119].

### **2.2.19. Селекція MPT63 та MPT83 специфічних клонів-продуцентів scFv антитіл**

Селекцію виконували як описано раніше в [120]. На дно лунок планшету іммобілізували цільові антигени (10 мкг/мл) та інкубували протягом ночі за 4° С. Після відмивання в лунки вносили по 150 мкл 1% розчину знежиреного молока в ЗФР та інкубували 60 хв за 37 °С. Паралельно відповідну кількість фагових частинок інкубували за тих самих умов у ТФБ, що містив блокувальний агент. Після відмивання в лунки вносили розчин фагових частинок та інкубували 2 год за 37°С. Рідину видаляли, а лунки багаторазово промивали. Наступним етапом було додавання в лунки гліцин-НСІ-буферу (рН 2,2) та інкубація протягом 10 хв. Елюйовані в такий спосіб фаги переносили у мікропробірки й нейтралізували рН, додаючи рівний об'єм трис-гліцинового буферу (рН 8,0), суміш переносили до 20 мл культури клітин *E.coli* штаму XL1-blue, нарощених до оптичної щільності, що відповідає  $A_{600} = 0,5$ . Клітини інкубували 90 хв за 37 °С за повільного перемішування, після чого бактерії висівали на поверхню агаризованого середовища 2YT, що містило 100 мкг/мл ампіциліну. Колонії, що виростили на чашках із твердим живильним середовищем упродовж ночі, підраховували й визначали загальний вихід клонів. За потреби з отриманих клітин виділяли фагові частинки для нового раунду селекції. В цілому, для відбору позитивних клонів було проведено три раунди селекції методом фагового дисплею у мікротитрувальних планшетах. Як антиген використовували рекомбінантні аналоги туберкульозних антигенів MPT63 MPT83, імуногенні властивості яких ідентичні нативним молекулам [121].

### **2.2.20. Фільтр-аналіз (Lift Assay) колоній**

Поодинокі колонії пересівали на тверде поживне середовище 2YT, що містило 100 мкг/мл ампіциліну та 2% глюкози, у чашки Петрі, розкреслені

12x12 (розмір кожної чарунки 0,5x0,5 см) та інкубували за 37° С протягом часу необхідного для росту колоній. Паралельно готували 2 нітроцелюлозні мембрани: верхню – призначену для відбитку колоній, протягом 1 год та 37° С витримували у розчині 5% сухого знежиреного молока у ЗФР, та нижню – призначену для детекції специфічних клонів, інкубували в розчині цільових антигенів МРТ63 або МРТ83 (10 мкг/мл), після чого додатково блокували в розчині 5% знежиреного молока. Після цього на чашки Петрі з середовищем 2YT, що містило 100 мкг/мл ампіциліну та 1 мМ індуктору експресії *lac*-оперону IPTG, поміщали нітроцелюлозні мембрани з іммобілізованими МРТ63 або МРТ83, іншу мембрану, заблоковану молоком, поміщали на чашки з колоніями, даючи їм відбитись. Потім, мембрану з відбитками колоній розміщували колоніями назовні на мембрані з іммобілізованими цільовими антигенами мікобактерій та залишали на ніч на 30° С. Після інкубації верхню мембрану з колоніями видаляли, а нижню аналізували за допомогою антитіл специфічних до маркеру scFv – E-тагу. Для цього мембрану витримували у розчині 1% молока при 37° С 40 хв, потім у розчині антитіл до E-тагу (1:6000) протягом 1 год. Інкубація у розчині вторинних анти-мишачих антитіл (1:5000) кон'югованих з ПХ проводили 1 год за 37° С. Результати візуалізували у розчині для проявлення (0,06% DAB, 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у ЗФР).

#### **2.2.21. Імунізація лабораторних тварин та отримання антисироваток до МРТ63, МРТ83 та МРТ83-МРТ63**

В роботі використовували BALB/c самиць мишей віком 4 міс. (30-35 г маси тіла), що мали вільний доступ до їжі та води. Тварини утримувались за стандартних умов щодо освітлення (12/12), температури (20-23° С) та вологості (30-35%) в акредитованому віварії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України відповідно до «Стандартних правил по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних

клінік (віваріїв)». Мишам мікобактеріальні антигени вводили по 25 мкг на одну тварину, в 1-2 сайти – підшкірно та 1 сайт – інтраперитонеально. Першу імунізацію проводили у повному, дві наступні – у неповному ад'юванті Фрейнда («Sigma», США) у співвідношенні антиген:ад'ювант – 1:1; інтервал між імунізаціями становив два тижні. Кров було відібрано з хвостової вени мишей. Для одержання сироваток кров без актикоагулянтів інкубували протягом 40 хв при кімнатній температурі та центрифугували протягом 30 хв за 2700 об/хв. Рівень специфічних антитіл проти антигенів *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83 у сироватках імунізованих мишей визначали методом непрямого імуноензимного аналізу (ІЕА) через 7 днів після останньої імунізації.

#### **2.2.22. Прямий та непрямий імуноензимний аналіз**

Розчин антигенів (MPT63, MPT83, MPT83-MPT63) у ЗФР, що містив 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,024% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 7,4, у концентрації 5 мкг/мл вносили в лунки планшету по 100 мкл на лунку. На кожному етапі внесені розчини інкубували протягом 1 год. за 37° С або протягом ночі за 4° С та тричі промивали лунки ЗФР. Потім вносили по 100 мкл 1%-ого розчину знежиреного молока («Sigma», США) у ЗФР. Після інкубації та відмивання в лунки планшету вносили сироватки імунізованих мікобактеріальними антигенами мишей, хворих на туберкульоз особин ВРХ та пацієнтів у відповідному розведенні (1:10-1:32000) в буфері ТФБ (ЗФР з додаванням 0,04% Tween-20). На наступному етапі в лунки вносили у буфері ТФБ антитіла проти Іg миші (1:10 000), людини (1:3000), бика (1:3000), кон'югованих з ПХ (пероксидаза хрому) («Sigma», США). Для проявлення використовували розчин ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидину), що містив H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Через 15 хв реакцію зупиняли, додаючи 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> по 50 мкл на лунку. Вимірювання оптичної густини проводили на спектрофотометрі за довжини хвилі 450 нм (референтна довжина хвилі – 620 нм).

Прямий ІЕА проводили з використанням антитіл до 6His тагу, кон'югованих ПХ (1:3000) («Sigma», США). Візуалізація результатів проводилась за аналогічною схемою.

### **2.2.23. Протокова цитофлуориметрія**

#### **2.2.23.1. Оцінка впливу MPT63 і MPT83 на фагоцитарну активність макрофагів**

Перитонеальні макрофаги миші виділяли у стерильному фізіологічному розчині та висівали на чашки Петрі діаметром 5 см, по  $1,5 \times 10^6$  клітин на чашку у середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном, 50 мг/л цефалотину та з додаванням фетальної сироватки теляти до кінцевої концентрації 10%. Через 4 год. інкубації в 5% атмосфері CO<sub>2</sub> при 37 °C не адгезовані клітини видаляли, додавали свіже середовище, та вносили у відповідні чашки MPT63, MPT83 чи mCherry до 0,25 мкМ концентрації. Клітини інкубували з відповідними антигенами протягом 30 хв, 1 год. та 3 год. Після чого відмивали фосфатним буфером, та вносили клітини *E.coli*, трансформовані зеленим флуоресцентним протеїном ( $1,5 \times 10^8$  клітин). Суспензію клітин інкубували протягом 30 хв за 4° C, після чого двічі відмивали 1 мл буферу ЗФР-БСА-NaN<sub>3</sub>, ресуспендували у 1 мл ЗФР-БСА-NaN<sub>3</sub> та вимірювали інтенсивність флуоресценції за допомогою протокового цитофлуориметра EPICS XL („Beckman Coulter”, США). Збільшення фагоцитарної активності клітин за впливу MPT63 і MPT83 визначали за зміною відносної величини флуоресценції у порівнянні з інтактними клітинами.

#### **2.2.23.2. Оцінка впливу мікобактеріальних антигенів на експресію маркерів активації макрофагів**

Макрофаги миші інкубували з цільовими рекомбінантними антигенами *M.tuberculosis* MPT63 і MPT83 та контрольним протеїном mCherry протягом

24 год. Після чого відмивали фосфатним буфером, та відкріплювали від поверхні, інкубуючи 10 хв у фосфатному буфері з 10 мМ ЕДТА. після цього брали по 300 тис клітин на проби для протокової цитофлуориметрії. Для визначення CD11b та F4/80 використовувались FITC-мічені моноклональні антитіла (ThermoScientific). Для забарвлення до 50 мкл клітинної суспензії ( $\sim 3 \times 10^5$  клітин) додавали 100 мкл буферу ЗФР-БСА- $\text{NaN}_3$  (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,024%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4, 0,2%  $\text{NaN}_3$ , 2% сироваткового альбуміна бика), що містив відповідну кількість антитіл (згідно рекомендацій виробника). Клітини інкубували протягом 30 хв за  $4^\circ \text{C}$ , після чого двічі відмивали 1 мл буферу ЗФР-БСА- $\text{NaN}_3$ , ресуспендували у 1 мл ЗФР-БСА- $\text{NaN}_3$  та вимірювали інтенсивність флуоресценції за допомогою протокового цитофлуориметра EPICSXL („BeckmanCoulter”, США).

### **2.2.23.3. Пошук поверхневих та внутрішньоклітинних мішеней рекомбінатних протеїнів MPT63 та MPT83**

Для пермеабілізації клітин їх промивали у BSA/ЗФР (0,14 М NaCl, 0,03 М KCl, 0,011 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,002 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1% BSA, pH 7,2). Після центрифугування і осадження клітин, надосад відбирали, а клітини ресуспендували 0,25% розчині параформальдегіду в ЗФР (приблизно 1 мл на  $10^6$  кл.) та інкубували протягом ночі при  $4^\circ \text{C}$ . Після фіксації клітини осаджували протягом 5 хв. 300 g та відмивали ЗФР (0,14 М NaCl, 0,03 М KCl, 0,011 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,002 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Пермеабілізацію проводили з додаванням в ЗФР детергента TritonX-100 («Sigma», США) до кінцевої концентрації 0,1% та інкубували 15 хв при  $37^\circ \text{C}$ . Потім клітини знову осаджували, ретельно промивали від детергенту та фарбували FITC-міченими протеїнами та антигенами, злитих з червоним флуоресцентним білком mCherry при  $4^\circ \text{C}$  30 хв.

Для забарвлення клітин mCherry-MPT63, mCherry-MPT83 та FITC-MPT63 і FITC-MPT83 до 50 мкл клітинної суспензії ( $\sim 5 \times 10^5$  клітин) додавали

100 мкл буферу ЗФР-БСА- $\text{NaN}_3$  (0,8%  $\text{NaCl}$ , 0,02%  $\text{KCl}$ , 0,144%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,024%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,4, 0,2%  $\text{NaN}_3$ , 2% сироваткового альбуміна бика), що містив відповідну кількість флуоресцентних похідних мікобактеріальних антигенів. Клітини інкубували протягом 30 хв за  $4^\circ\text{C}$ , після чого тричі відмивали 1 мл буферу ЗФР-БСА- $\text{NaN}_3$ , ресуспендували у 1 мл ЗФР-БСА- $\text{NaN}_3$  та вимірювали інтенсивність флуоресценції тим же методом протокової цитофлуориметрії.

#### **2.2.24. Підготовка та аналіз фіксованих препаратів для конфокальної мікроскопії**

Клітини лінії U2149, J774 та перитонеальних макрофагів миші, вирощені на покривних скельцях до субконфюентного стану, промивали двічі по 1 мл ЗФР-БСА. МРТ63 та МРТ83 додавали в RPMI-1640 з розрахунку по 0,25 мкмоль/мл. Для контрастування ядер використовували Hoechst 33342. Інкубацію проводили протягом 30 хв при  $4^\circ\text{C}$  та 5%  $\text{CO}_2$ . Після чого промивали клітини двічі по 1 мл ЗФР-БСА та додавали розчин 0,25% параформальдегіду та інкубували 40 хв. при  $4^\circ\text{C}$ . Далі двічі відмивали незв'язаний параформальдегід ЗФР та дистильованою водою. На скельця наносили по 25 мкл розчин MOVIOL/Dabco, та фіксували покривельне скло з клітинами на предметному склі. Препарати аналізували за допомогою конфокального мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 Meta.

При дослідженні фагоцитозу для отримання клітин *E.coli*, штам-продуцент EGFP підрощували протягом 3-х годин, після чого додавали індуктор експресії IPTG та інкубували протягом ночі за  $20^\circ\text{C}$ . Клітини J774 нарощували за методикою, аналогічною наведеній у попередніх підрозділах.

Експеримент проводили у плоскодонних планшетах, з об'ємом поживного середовища 1 мл на лунку. Розрахована кількість клітин J774 на лунку складала приблизно  $1 \cdot 10^5$ . Кількість клітин *E.coli*, що додавали у лунку складала приблизно  $0.5 \cdot 10^6$ . Кількість доданого МРТ63 складала близько

5мкг на лунку, у контрольні лунки замість МРТ63 додавали бичачий сироватковий альбумін. Після додавання бактерій та рекомбінантного протеїну планшети тримали у термостаті за 37°C протягом години. Незв'язані клітини бактерій відмивали фосфатним буфером. Перед мікроскопією ядра фарбували вітальним барвником Hoechst 33342, флюоресцентну мікроскопію проводили на мікроскопі Carl Zeiss Axiovert 200.

### **2.2.25. Статистична обробка отриманих результатів**

Математичний аналіз та статистичну обробку 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 ( $m$ ).

## РОЗДІЛ 3 СТВОРЕННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ АНТИГЕНІВ ТА ЇХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ПОХІДНИХ

### 3.1. Отримання та характеристика повнорозмірного антигену *M.tuberculosis* MPT83

З метою пошуку популяцій клітин, що здатні зв'язувати MPT83, ми клонували повнорозмірний MPT83 у клітинах *E. coli*. Для цього ампліфікували ген *mpt83* з ДНК VCG *M. tuberculosis* за допомогою ПЛР. Клонування здійснювали в *E. coli* штаму Rosetta за допомогою вектору рЕТ24а+ (рис.3.1).

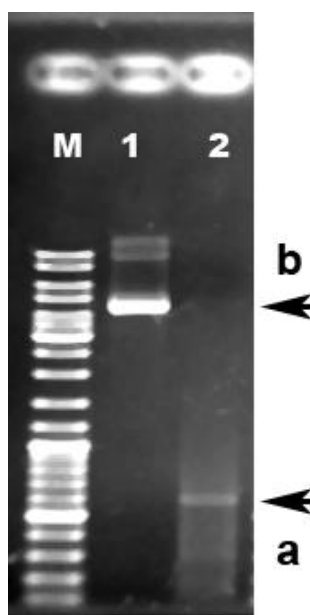


Рис. 3.1. Електрофореграма плазмідної ДНК рЕТ24а+ (1,b) та вставки – повнорозмірного гену *mpt83* (2,a). М – маркери (100-10 000 п.н.)

Повнорозмірний MPT83 був очищений методом ІМАС (immobilized metal-ion-affinity chromatography, афінна хроматографія на іммобілізованих іонах металів). Вихід продукту склав 108 мг з 1 л культури *E. coli*.

Цікавим виявилось те, що цей протеїн синтезувався у розчинній формі, на відміну від його попередника МРТ83 (115-220) [122], який накопичувався виключно в тільцях включення (рис.3.2).

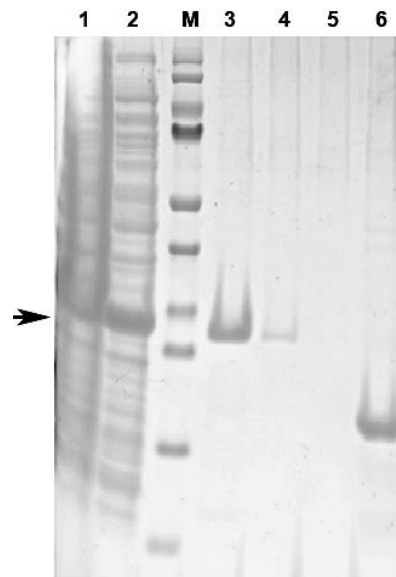


Рис. 3.2. Результати аналітичної експресії повнорозмірного МРТ83. 1 – лізат клітин продуцента, 2 – розчинна фракція, 3-5 фракції елюату, 6 – фрагмент МРТ83 115-220; М – маркери (10-180 кДа). Стрілкою вказане положення повнорозмірного МРТ83

Також встановлено, що електрофоретична рухливість повнорозмірного МРТ83 практично не залежала від наявності відновлювальних агентів, що говорить про відсутність схильності до димеризації (фрагмент МРТ83 115-220 був схильний до утворення димерів), що, в свою чергу, може свідчити про коректне формування внутрішньомолекулярного дисульфідного зв'язку (рис. 3.3).

Таким чином, нами отриманий рекомбінантний МРТ83, що може бути використаний у подальших дослідженнях, спрямованих на вивчення його функцій та механізмів впливу на клітини-мішені під час розвитку туберкульозної інфекції. Також наведені дані свідчать про коректний фолдинг отриманого протеїну МРТ83.

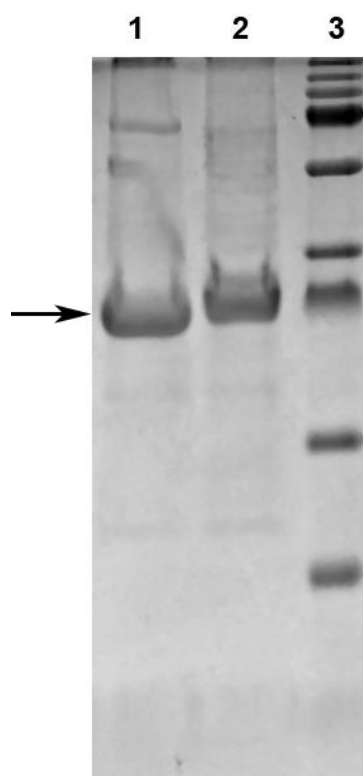


Рис. 3.3. Залежність електрофоретичної рухливості очищеного протеїну від способу приготування проб. 1 – повнорозмірний МРТ83 за відсутності бета-меркаптоетанолу, 2 – повнорозмірний МРТ83 за наявності бета-меркаптоетанолу, 3 – маркери (10-180 кДа). Стрілкою вказане положення повнорозмірного МРТ83

### 3.2. Створення злитих протеїнів на основі антигенів *M.tuberculosis* МРТ63 та МРТ83 та червоного флуоресцентного протеїну

За допомогою сконструйованих праймерів, отримані послідовності ДНК були фланковані сайтами рестрикції. Були отримані ампліфіковані ПЛР-продукти *mpt63*, *mpt83* (рис 3.4.) та *mCherry* з плазмідних ДНК *pET24a*-МРТ63, *pET24a*-МРТ83 та *pmCherry*, необхідних для побудови нових конструкцій, що експресуватимуть флуоресцентні похідні мікобактеріальних протеїнів. Зразки ДНК наносили на агарозний (1%) гель. Після візуалізації

зроблено висновок, що ампліфікації генів мікобактеріальних протеїнів та виділення плазмідної ДНК пройшло коректно.

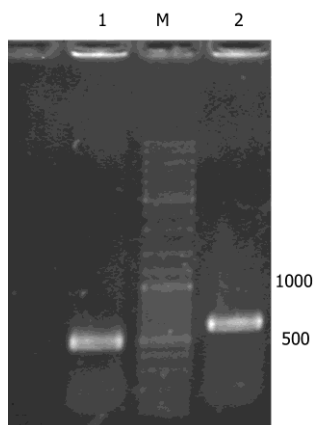


Рис. 3.4. Електрофореграма ПЛР-продуктів. Трек 1 — *mpt63* (на рівні 500 п.н.), трек 2 — *mpt83* (приблизно 600 п.н.). М — маркери (100 – 10 000 п.н.)

Методом ПЛР було отримано і ампліфіковано ген флуоресцентного протеїну mCherry. На електрофореграмі (рис 3.5.) показано отриману плазмідну ДНК *pET28a*, унікальність якої полягає у наявності спеціальних сайтів рестрикції для конструювання злитих протеїнів mCherry-MPT63 та mCherry-MPT83.

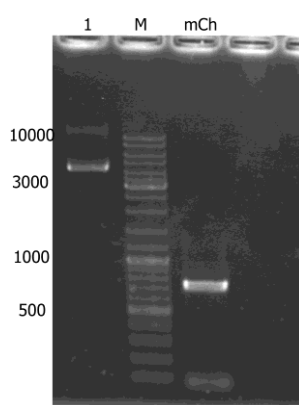


Рис. 3.5. Електрофореграма виділеної плазмідної ДНК *pET28a(1)* та ампліфікованого продукту — гену флуоресцентного протеїну(mCh). Продукт *mCherry* відповідає приблизно 700 п.н.

Побудова конструктів *pET28a-mCherry-MPT63* та *pET28a-mCherry-MPT83* від початку експерименту полягала в поетапному введенні генів *mCherry* (рис 3.6.), по сайтах *EcoRI* і *BamHI*, а потім *mpt63* або *mpt83*, по сайтах *EcoRI* та *XhoI* в плазмідну ДНК *pET28a*.

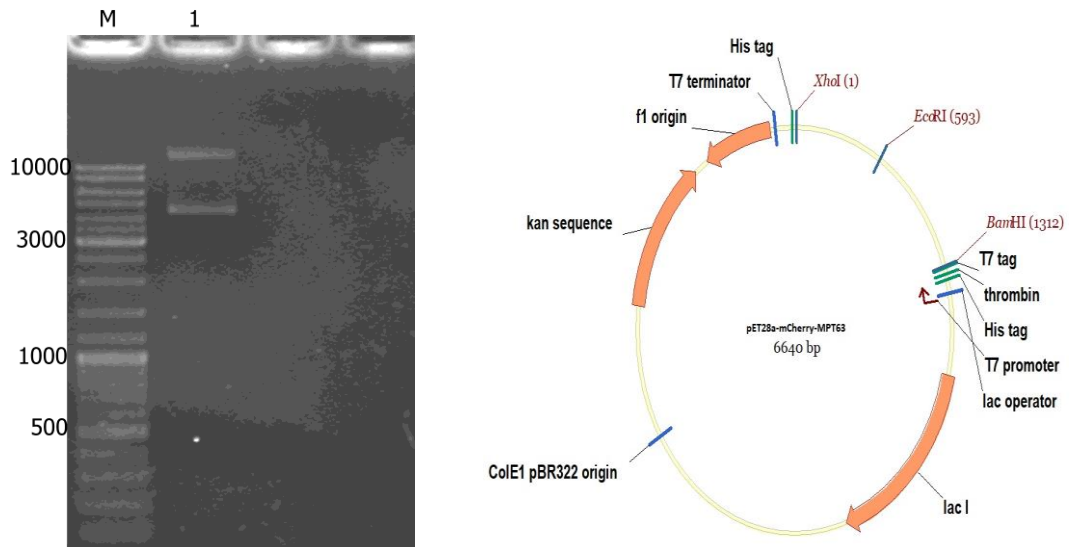


Рис. 3.6. Електрофореграма побудованого конструкту *pET28a-mCherry(1)*. Дві смуги свідчать про наявність суперспіралізованої та релаксованої форми кільцевої ДНК. М — маркери (100 – 10 000 п.н.) (А). Схематичне зображення генетичної конструкції *pET28a-mCherry-MPT63* (Б)

Після остаточного лігування генів протеїнів *M. tuberculosis* в *pET28a-mCherry*, клони, які вирости після посіву електропорованих клітин, перевіряли на наявність коректної вставки методом ПЛР. Матрицею в цьому випадку слугував мазок відповідних колоній з чашки Петрі (рис. 3.7, 3.8).

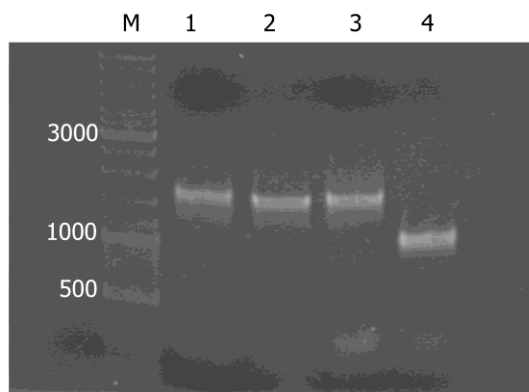


Рис. 3.7. Електрофореграма ПЛР-продуктів клонів. Смути 1, 2, 3 — свідчать про наявність вставки *mCherry-mpt63* у клонах, 4-та смуга свідчить лише про наявність *mCherry* у плазмідній ДНК

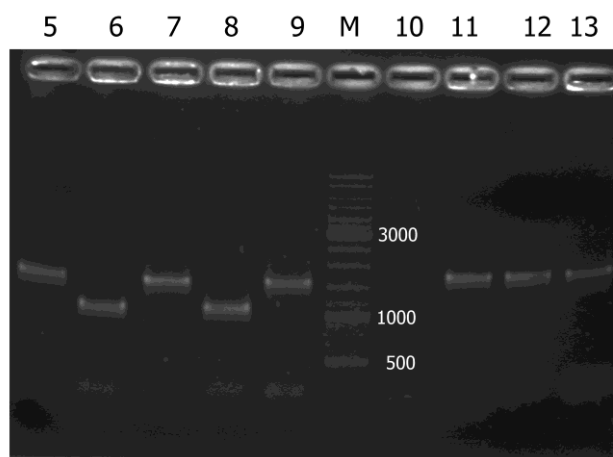


Рис. 3.8. Електрофореграма ПЛР-продуктів клонів. Смути 5, 7, 9 — свідчать про наявність *mCherry-mpt63* у клонах, а смуги 6, 8 — про наявність нуклеотидної послідовності *mCherry* у плазміді. Клони 11, 12, 13 — *mCherry-mpt83*. Клон 10 позбавлений будь-яких конструкцій

Клони висівали для нарощування, витримували упродовж ночі при активній аерації і температури 37 °С в середовищі з глюкозою, потім 3,5 год з індуктором експресії IPTG також при активній аерації, але за температури 30°С. Клітини відцентрифугували, лізували та виділяли антигени за допомогою металафінної хроматографії. Молекулярна маса злитих протеїнів

відповідала очікуваній, що згідно з теоретичними розрахунками складає 46,8 кДа для mCherry-MPT63 і 50,1 кДа для mCherry-MPT83 (рис. 3.9). Аналіз експресії показав, що вихід mCherry-MPT83 становив 75 мг на 1 л культури *E.coli*, а mCherry-MPT63 – 36 мг, при цьому близько 16% цільового білка синтезувалося в розчинній формі (ідентифікація продукту у ЗФР), і 84% – у формі тілець включень (ідентифікація продукту у буфері з сечовиною). Відсоток рекомбінантного протеїну від загального пулу протеїнів *E.coli* склав 33,8% для mCherry-MPT83 і 28,3% для mCherry-MPT63.

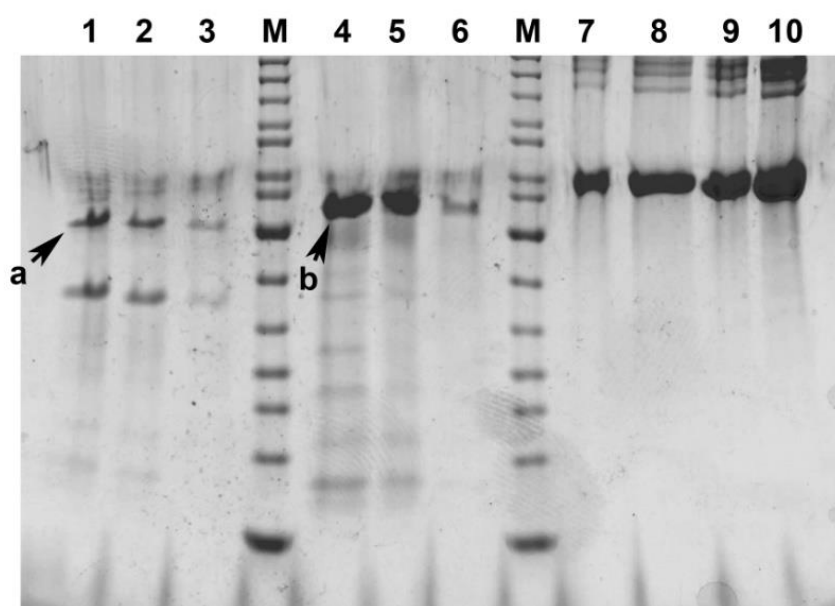


Рис. 3.9. Електрофореграма фракцій елюату mCherry-MPT63 (1, 2, 3) та mCherry-MPT83(4, 5, 6); бичачий сироватковий альбумін різної концентрації (7-10). М – маркери (10-200 кДа). Стрілками вказано цільові протеїни mCherry-MPT63(a) та mCherry-MPT83(b)

На підставі електрофореграми (рис. 3.9), на якій візуалізуються продукти нижче очікуваній молекулярній масі, можна констатувати факт явного протеолізу цільових протеїнів у клітинах *E.coli* в процесі їх синтезу або вже під час виділення через недотримання певних параметрів (температури, відсутності інгібіторів протеїназ тощо).

На рис. 3.10 та 3.11. показаний аналіз різних фракцій (розчинної та тілець включень) цільових протеїнів.

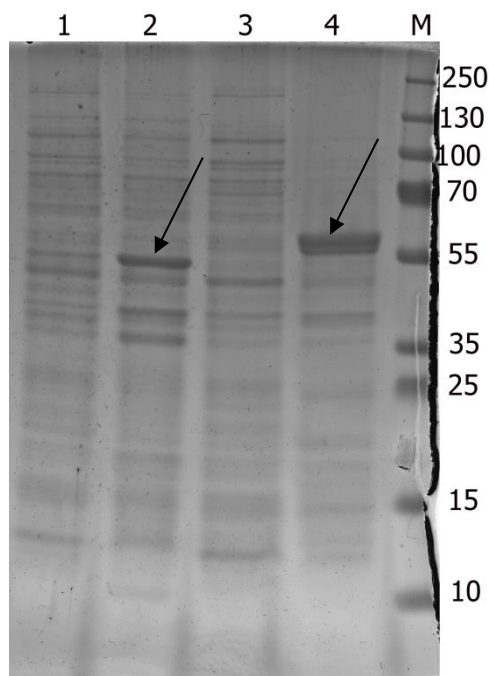


Рис. 3.10. Аналіз mCherry-MPT63 (1-розчинна фракція, 2-тілець включень) та mCherry-MPT83 (3-розчинна, 4-фракція тілець включень). М – маркери, кДа

Як видно з електрофореграми (рис. 3.10) та блотограми (рис. 3.11), переважна кількість продуктів (86% від цільового білка) ідентифікується в тілецях включень (флуоресцентні похідні у цій фракції показано стрілками)

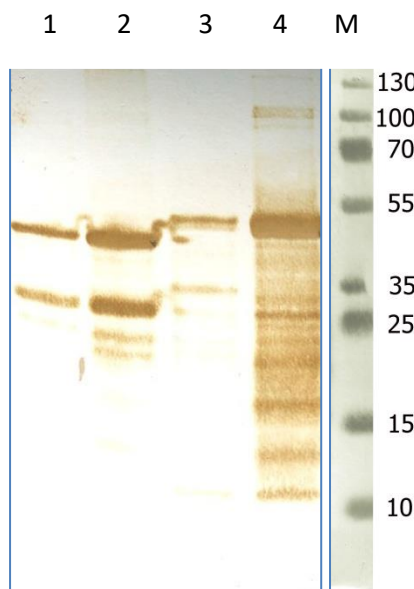


Рис. 3.11. Блотограма попереднього електрофорезу: mCherry-MPT63 (1 — розчинна фракція, 2—тільця включень), mCherry-MPT83 (3 —розчинна фракція, 4—тільця включень). Ідентифікацію протеїнів проводили за допомогою anti-His tag антитіл, що зв'язувались з 6xHis хвостом цільових протеїнів

### 3.3. Отримання генетичної конструкції, що кодує химерний протеїн MPT83-MPT63

Раніше нами було отримано неповнорозмірний аналог протеїну MPT83 (115-220, фрагмент fasciclin-подібного домену 94-217) [122], що використовувався для створення тест-систем на основі ІЕА для діагностики туберкульозу ВРХ. Цінність створення химерного протеїну на основі повнорозмірного рекомбінантного MPT83 полягає у відтворенні унікальних імунобіологічних властивостей вихідного антигену. Так, злитий протеїн на основі повнорозмірного MPT83, на відміну від MPT63-MPT83(115-220), може характеризуватися кращими антигенними характеристиками, що впливатиме на чутливість та специфічність проведення аналізу.

Ген *mpt83* був ампліфікований з ДНК отриманої раніше генетичної конструкції *pET24a-mpt83* за допомогою ПЛР. Клонування здійснювали із використанням *E.coli* штаму Rosetta на основі вектору *pET28a(+)* (Рис. 3.12).

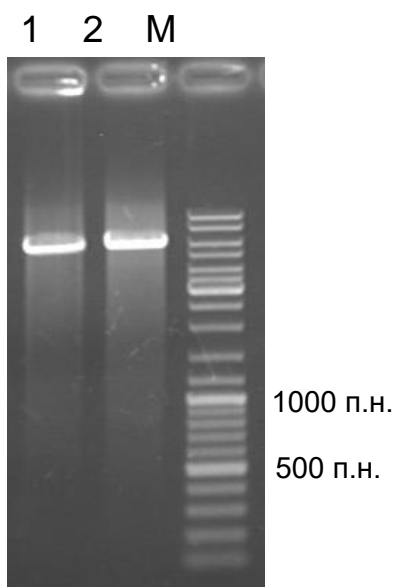


Рис. 3.12. Електрофореграма виділеного плазмідного вектора *pET28a* (1) та створеної на першому етапі клонування генетичної конструкції на основі вектора *pET28a*, що несе у собі вставку повно розмірного гену МРТ83 (2). М – маркери молекулярної маси (пар нуклеотидів, п.н.)

З метою подальшого об'єднання генетичних послідовностей *mpt83* та *mpt63* було створено генетичну конструкцію *pUC-19-mpt63*. Слід зазначити, що генетична конструкція *pUC-19-mpt63* була створена також з метою подовження нуклеотидної ділянки перед сайтом ендонуклеази рестрикції *HindIII*. Клонування гену *mpt63* здійснювали за затупленими кінцями.

Як відомо, внаслідок клонування за «затупленими» кінцями є висока ймовірність дублювання послідовностей гена у плазмідній конструкції. За рахунок такого феномену нами було виділено клон *pUC-19-(mpt63)<sub>2</sub>* при обробці якого ендонуклеазою рестрикції *HindIII* утворюється не

одноланцюговий розрив з подальшою лінеаризацією ДНК, а окремо 2 продукти – *mpt63* та *pUC-19-mpt63* (Рис. 3.13).

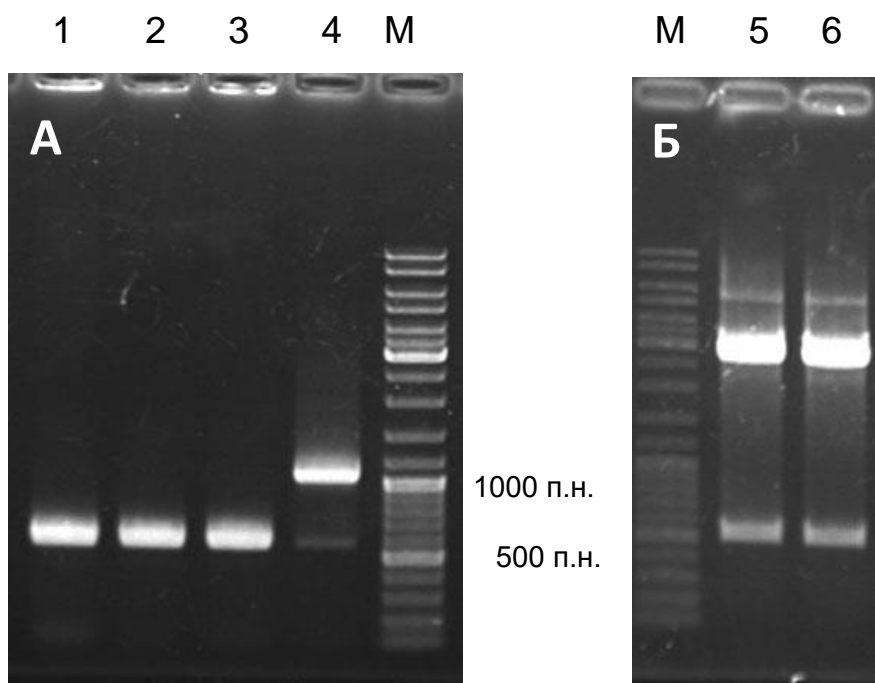


Рис. 3.13. А. Електрофореграма продуктів за результатами ПЛР аналізу з використанням праймерів, що фланкують полілінкерну ділянку вектору. 1-3 – продукти ПЛР, що відповідають нуклеотидній послідовності гену *mpt63*; 4 – ПЛР продукт, що відповідає димеру двох нуклеотидних послідовностей гену(*mpt63*)<sub>2</sub>. Б. 5-6 – генетична конструкція *pUC-19-(mpt63)*<sub>2</sub> після обробки ендонуклеазою рестрикції *Hind*III (кільцева та лінеаризована форми плазмідної ДНК та ген *mpt63*). М – маркери молекулярної маси (пар нуклеотидів, п.н.)

Отриману у такий спосіб нуклеотидну послідовність гену *mpt63* обробляли ендонуклеазою рестрикції *Xho*I для подальшого об'єднання із раніше отриманою генетичною конструкцією *pET28a-mpt83*. З метою визначення наявності об'єднаної нуклеотидної послідовності *mpt63-mpt83* у складі генетичної конструкції проводили ПЛР аналіз із застосуванням

праймерів, що фланкують ген *mpt63* з одного боку та ген *mpt83* – з іншого. Результати проведення ПЛР аналізу засвідчили наявність об'єднаної нуклеотидної послідовності *mpt63-mpt83* у складі генетичної конструкції *pET28a-mpt83-mpt63* розміром 1300 пар нуклеотидів (Рис. 3.14).

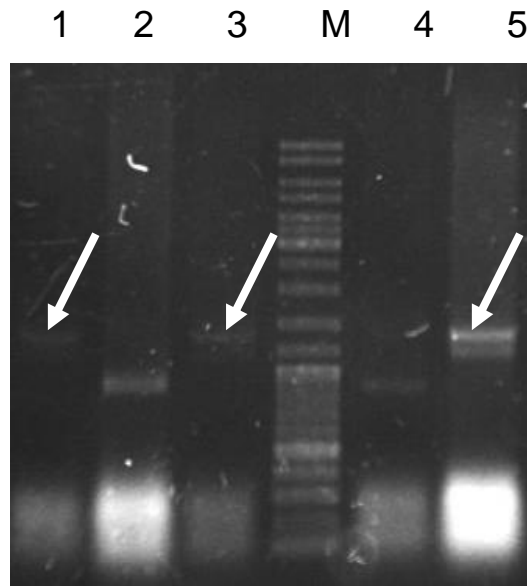


Рис. 3.14. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу клонів *E.coli* трансформованих генетичною конструкцією *pET28a-mpt83-mpt63*. Клони 1, 3 та 5 несуть генетичну конструкцію із об'єднаними нуклеотидними послідовностями генів *mpt83* та *mpt63* (показано стрілкою); М – маркери (100 – 10 000 п.н.)

### 3.4. Висновки до розділу

1. Одержано рекомбінантні антигени *M.tuberculosis* та їх флуоресцентні похідні: МРТ83, mCherry-МРТ63, mCherry-МРТ83, химерний протеїн МРТ83-МРТ63.
2. Розроблено протокол експресії, виділення, очищення та методик ренатурації мікобактеріальних протеїнів.

Результати, представлені у даному розділі, опубліковано у власних наукових працях [155, 157].

## РОЗДІЛ 4 ВЗАЄМОДІЯ АНТИГЕНІВ *M.TUBERCULOSIS* MPT63 ТА MPT83 ІЗ КЛІТИНАМИ-МІШЕННЯМИ

### 4.1. Дослідження взаємодії флуоресцентних похідних *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83 з первинними культурами клітин ссавців

MPT63 є секреторним протеїном мікобактерій з досі невідомою функцією. Його передбачуваними мішенями можуть бути як клітини імунної системи, так і клітини інших тканин та органів.

Оскільки макрофаги є основною мішенню збудника туберкульозу, ми припустили, що саме вони є мішенню для MPT63. Тому ми дослідили зв'язування цього мікобактеріального антигену з перитонеальними макрофагами миші.

Проте з первинною культурою макрофагів достовірного зв'язування виявити не вдалося (рис. 4.1)

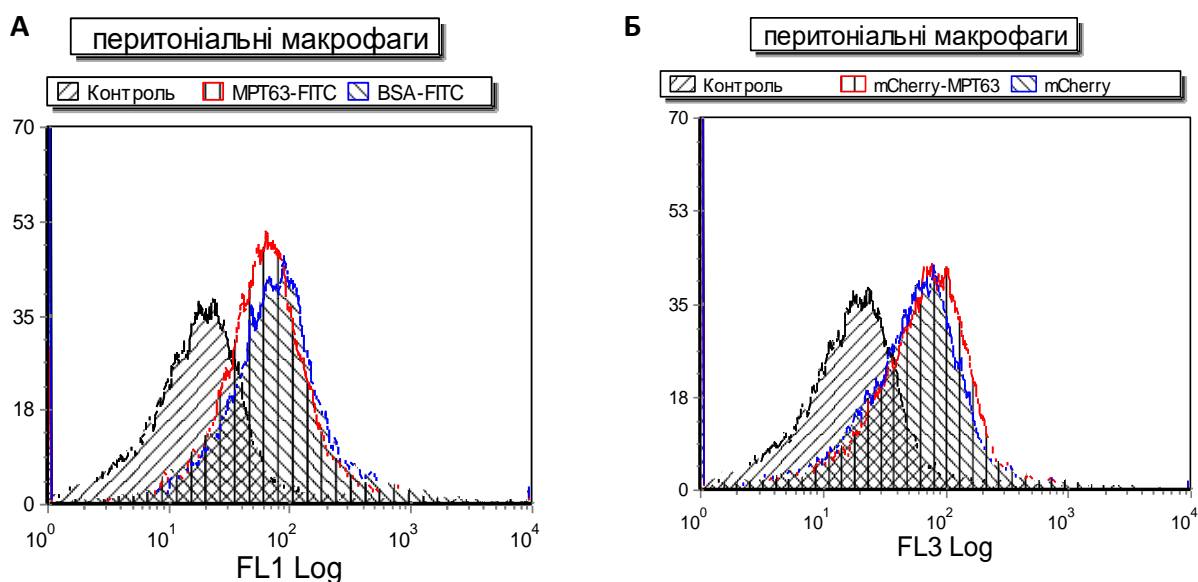


Рис. 4.1. Гістограми інтенсивності флуоресценції перитонеальних макрофагів, інкубованих з антигеном *M.tuberculosis* MPT63, кон'югованого з FITC (А), та зшитого з червоним флуоресцентним протеїном mCherry (Б).  
Протокова цитофлуориметрія

Оскільки з первинними макрофагами миші виявити зв'язування не вдалось, ми повторили експеримент на спленоцитах миші (рис. 4.2). В цьому випадку дуже чітко ідентифікувалась субпопуляція, що забарвлювалась МРТ63. Однак в селезінці представлені різні клітини, включно з лімфоцитами, макрофагами, дендритними клітинами на різних стадіях диференціювання, та стромальними клітинами, що взагалі не належать до імунної системи. Тому надалі ми дослідили зв'язування МРТ63 з клітинними лініями, що є моделями лімфоцитів, фібробластів та епітеліоцитів (наступний підрозділ).

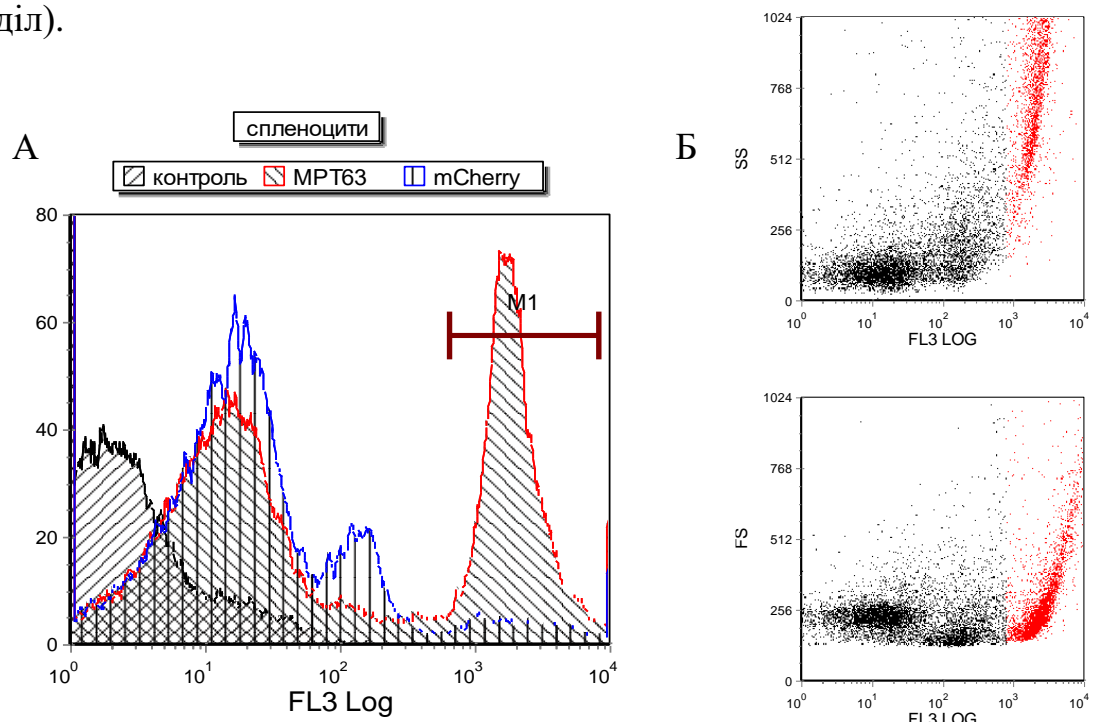


Рис. 4.2. Гістограма інтенсивності флуоресценції спленоцитів миші, інкубованих з флуоресцентно міченим МРТ63 (А). Розподіл клітин за боковим (Side Scatter, SS) та прямим (Forward Scatter, FS) світлорозсіюванням, що характеризують гранулярність і розміри клітин відповідно (Б)

Було досліджено зв'язування FITC-міченого МРТ83 із поверхнею перитонеальних макрофагів миші (рис. 4.3). Проте, хоча на макрофагах присутній відомий з літератури рецептор МРТ83 – TLR2, виявити таке зв'язування не вдалося. Вірогідно це пояснюється тим, що рівень

представленості TLR2 на поверхні макрофагів є невисоким. В роботах, в яких було показано, що TLR2 є мішенню для MPT83, безпосереднє зв'язування MPT83 з TLR2 продемонстровано або в умовах *in vitro* або на трансфікованих клітинах HEK293 з надекспресією TLR2 [53, 54].

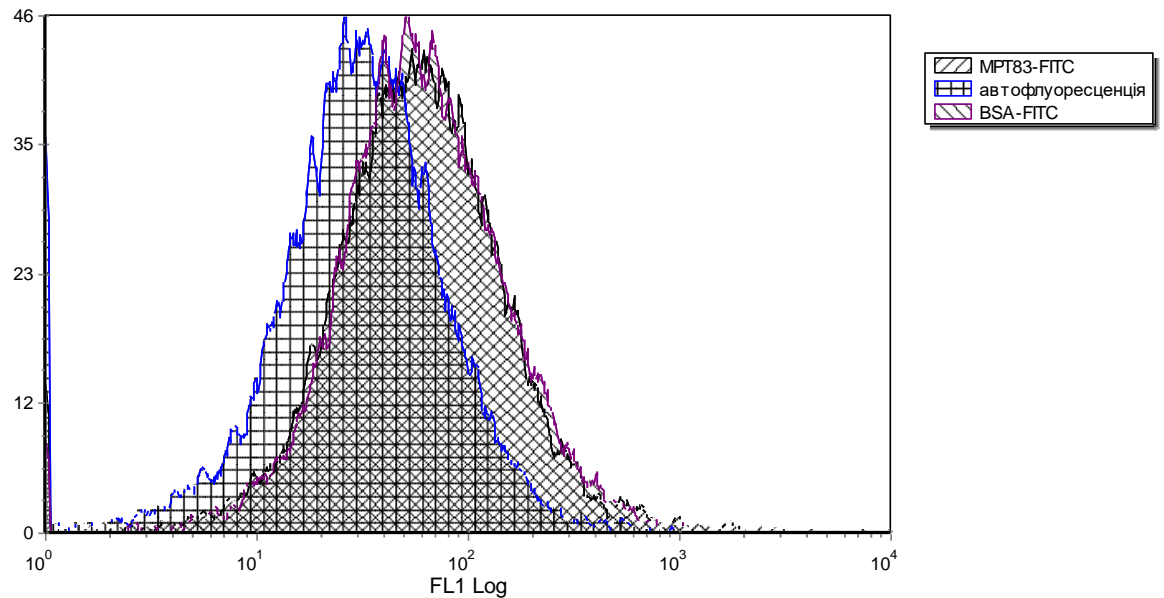


Рис. 4.3. Гістограми інтенсивності флуоресценції перитонеальних макрофагів миші інкубованих з флуоресцентним похідним MPT83

#### 4.2. Дослідження взаємодії флуоресцентно-міченого MPT63 з поверхнею малігнізованих клітин імунної системи

При виконанні цього етапу було визначено зв'язування MPT63 з невеликою субпопуляцією клітин U937, що дозволяло припустити, що мішенню MPT63 може бути окрема субпопуляція моноцитарних клітин. Тому ми дослідили зв'язування цього мікобактеріального протеїну з низкою клітинних ліній, що є моноцито- чи макрофагоподібними, Як видно з рис. 4.4, так само, як і в попередніх дослідженнях при забарвленні U937 виділялась невелика субпопуляція клітин, що взаємодіяли з MPT63. Проте, а

ні з мишачими перитонеальними макрофагами, а ні з іншими моноцито- та макрофагоподібними клітинами достовірного зв'язування виявити не вдалося

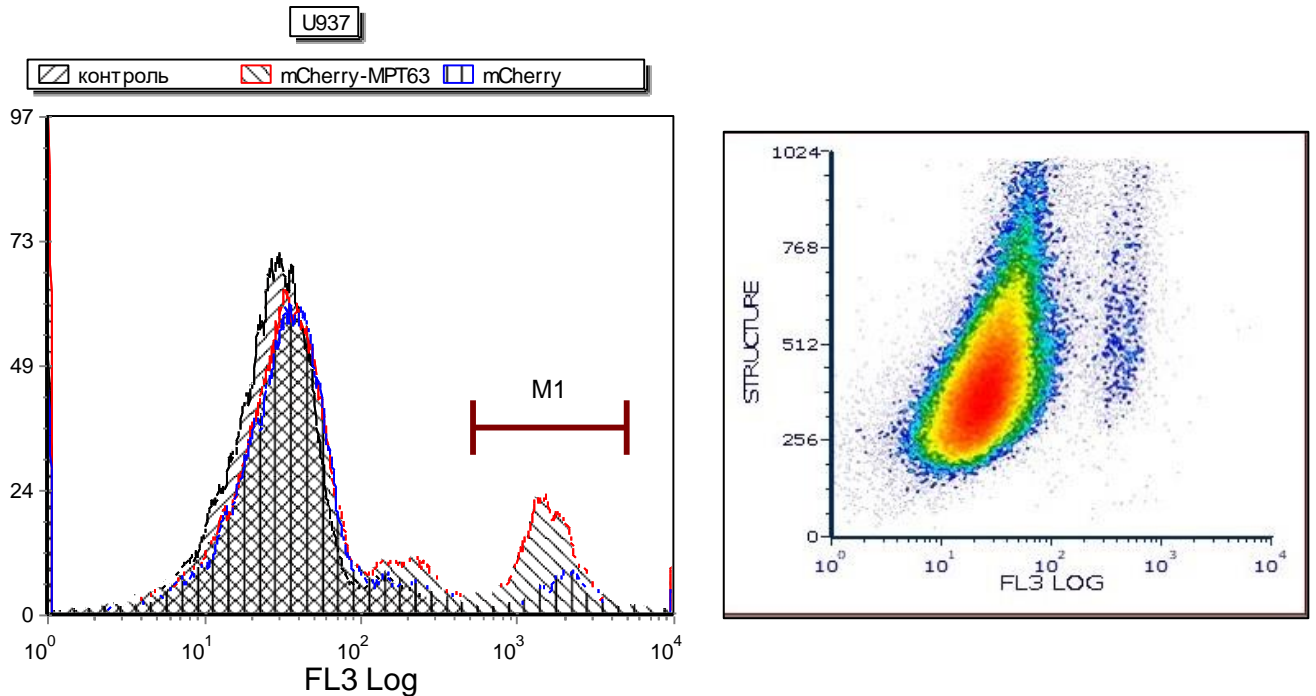


Рис. 4.4. Гістограми інтенсивності флуоресценції клітин лінії U937 інкубованих з флуоресцентно міченим МРТ63 Протокова цитофлуориметрія

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  $\epsilon$ -аміногрупами амінокислоти лізину). Однак в обох випадках результат був подібний (рис. 4.5).

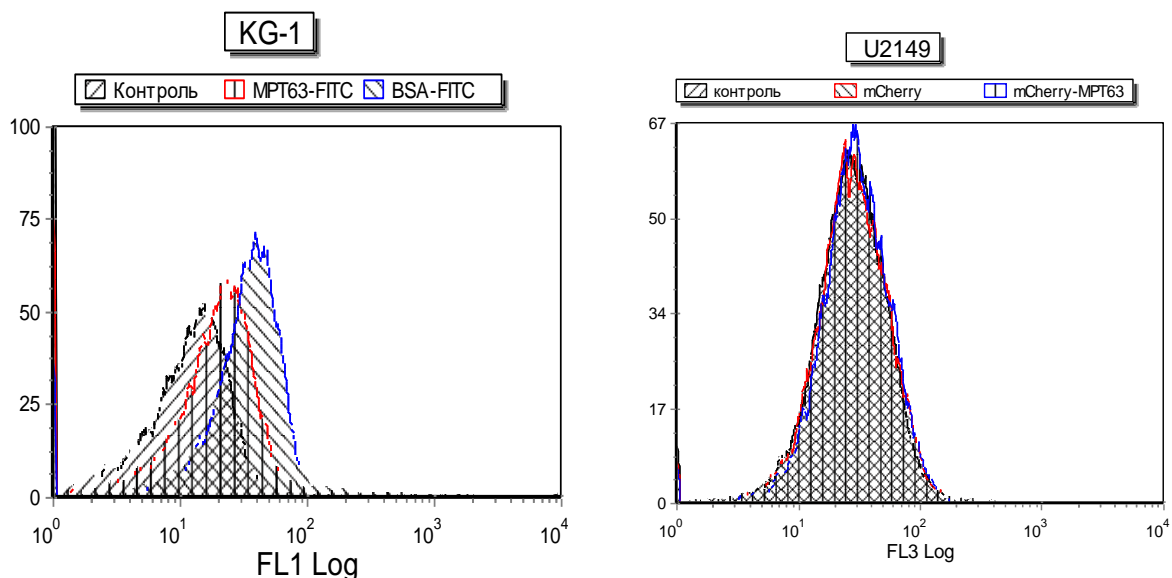


Рис. 4.5. Гістограма інтенсивності флуоресценції клітин лінії U2149 (фіброїдна гістіоцитома людини) та KG1 (мієлобласти людини), інкубованих з флуоресцентно міченим МРТ63. Протокова цитофлуоремитрія

З неімуними клітинами організму ссавців - клітинами лінії 3Т3, що репрезентують фібробласти, і з А431, що репрезентують епітеліоцити достовірного зв'язування виявлено не було (рис. 2.24).

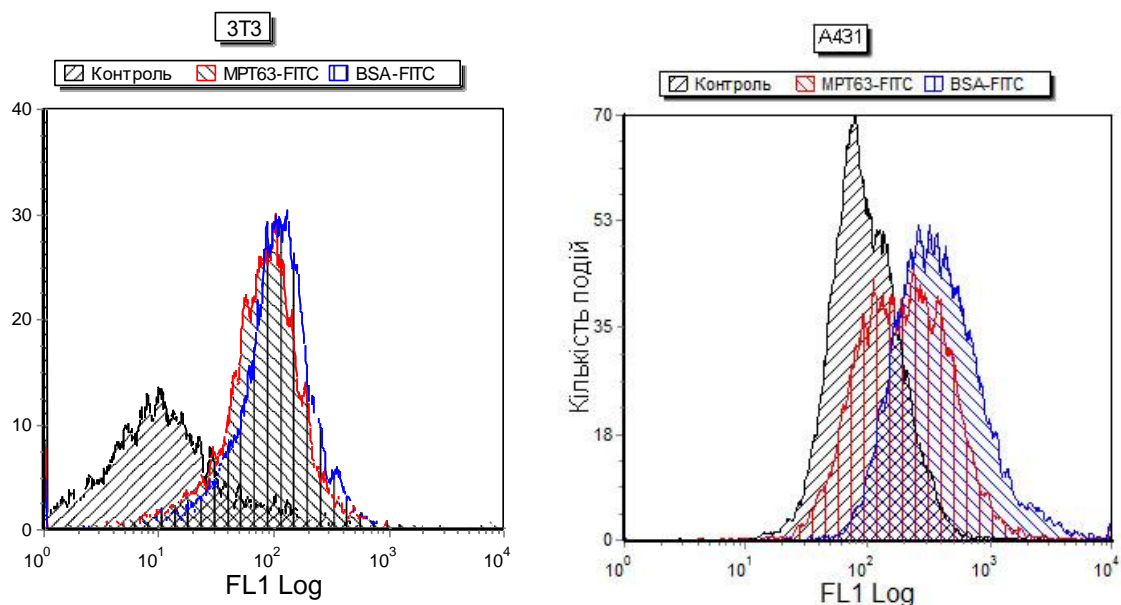


Рис. 4.6 Гістограма інтенсивності флуоресценції клітин ліній 3Т3 та А431, інкубованих з флуоресцентно міченим МРТ63. Протокова цитофлуоремитрія

Так само зв'язування не спостерігалось із клітинами X63, що репрезентують лімфоцити (рис. 4.7).

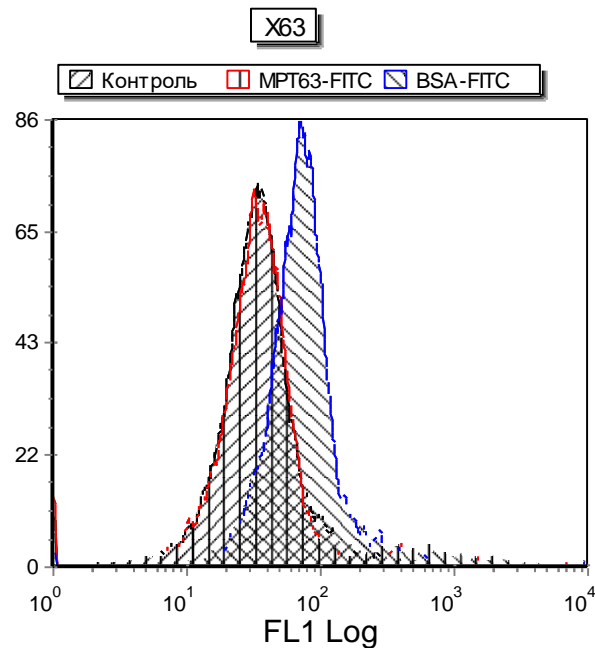


Рис. 4.7. Гістограма інтенсивності флуоресценції клітин лінії X63, інкубованих з флуоресцентно міченим MPT63. Протокова цитофлуореметрія

Таким чином, згідно отриманих даних MPT63 зв'язувався з певною популяцією клітин селезінки, а також з невеликою субпопуляцією клітин U937, проте зв'язування із клітинами, що є моделлю фібробластів, епітелію та лімфоцитів не було зафіксовано. Так само не вдалося виявити зв'язування із дослідженими моноцито- та макрофагоподібними клітинами. Отже, клітинами-мішенями можуть бути або не досліджені популяції (наприклад дендритні клітини) або макрофаги на певній стадії диференціювання (на користь чого дуже опосередковано свідчить зв'язування з незначною частиною клітин U937).

### 4.3. Пошук внутрішньоклітинної мішені MPT63-FITC

Mustafa та співавторами [123] було показано, що MPT63, як і деякі інші секреторні протеїни мікобактерій, можна виявити всередині запальних клітин

у легенях хворих на туберкульоз. Вочевидь, такі протеїни накопичуються у інфікованих клітинах внаслідок життєдіяльності мікобактерій. Проте існує ймовірність, що МРТ63 може мати також внутрішньоклітинну мішень, діючи безпосередньо на інфіковані клітини. Тому ми також перевірили зв'язування МРТ63 з пермеабілізованими макрофагами, щоб дослідити можливу наявність внутрішньоклітинних мішеней. Проте, як видно з рис. 4.8, різниці у зв'язуванні із МРТ63 та з контрольним антигеном не спостерігалось.

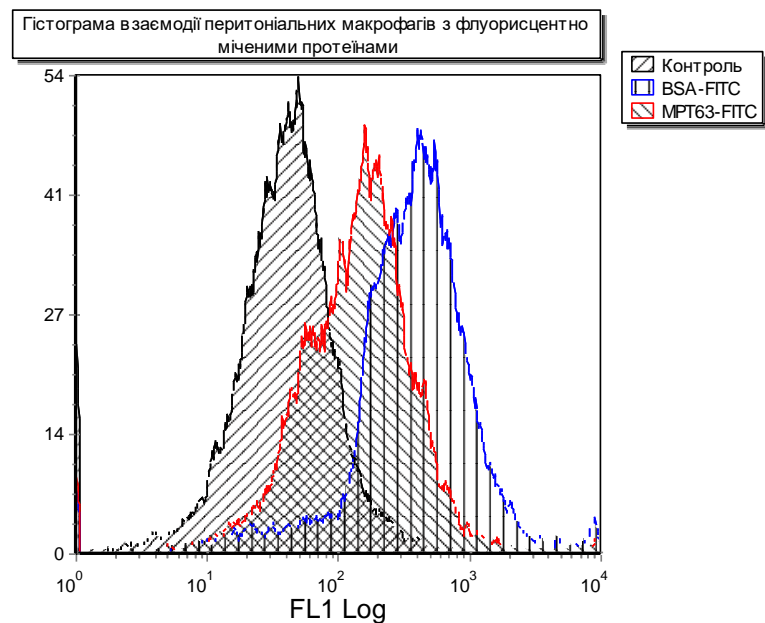


Рис. 4.8. Гістограма інтенсивності флуоресценції пермеабілізованих перитонеальних макрофагів миші, інкубованих з флуоресцентно міченим МРТ63. Протокова цитофлуориметрія

При забарвленні пермеабілізованих перитонеальних макрофагів в частині клітин при мікроскопічному дослідженні були помітні характерні структури, але такі клітини виявлялися як в зразках забарвлених МРТ63 так і в зразках контрольних інтактних клітин (рис. 4.9).

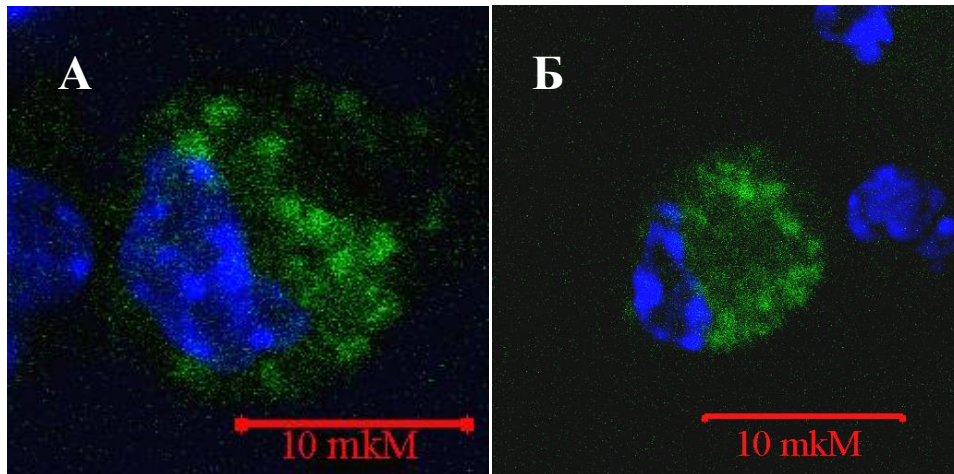


Рис. 4.9. Конфокальна мікроскопія препаратів пермеабілізованих перитонеальних макрофагів миші з флуоресцентно міченим МРТ63 (А) та інтактних клітин (Б)

#### 4.4. Визначення спорідненості флуоресцентно-міченого МРТ83 з клітинами лінії U2149

Антиген МРТ83 є мембранозв'язаним глікозильованим ліпопротеїном мікобактерій [54]. В арсеналі збудника туберкульозу є ціла низка молекул, які зв'язуються та активують TLR2 (ліпопротеїни LpqH, LprG, LprA та PhoS1, ліпоарабіноманани та ліпоманан, фосфатидилінозитолдіамінозид РІМ). Показано, що довготривала стимуляція TLR2 антигеном МРТ83 зрештою приводить до вироблення імуносупресивних цитокінів (зокрема ІЛ-10 та ІЛ-4) та зниження еспресії МНСІІ і пригнічення процесінгу антигенів макрофагами дикого типу [53]. Згідно наявних в літературі даних можна припустити, що МРТ83 має подібний ефект і є ще однією молекулою мікобактерій, що дозволяє їм уникати контролю імунної системи.

Проте зафіксувати зв'язування МРТ83 з перитонеальними макрофагами чи з клітинами лінії U937, для яких показано експресію TLR2 [124] не вдалось. Вочевидь, це пов'язано з низьким рівнем експресії TLR2. Імуноцитохімічно зв'язування МРТ83 з клітинами-мішенями досі було

продемонстровано лише на клітинах HEK293, трансфікованих TLR2 [54, 125].

Але ми виявили, що зв'язування MPT83 з поверхнею клітин можна зафіксувати при забарвленні лінії U2149. Результати, отримані методом протокової цитофлуориметрії, також підтверджувались і на мікроскопічних знімках: MPT83 специфічно зв'язувався з поверхнею клітин (рис. 4.10, 4.11).

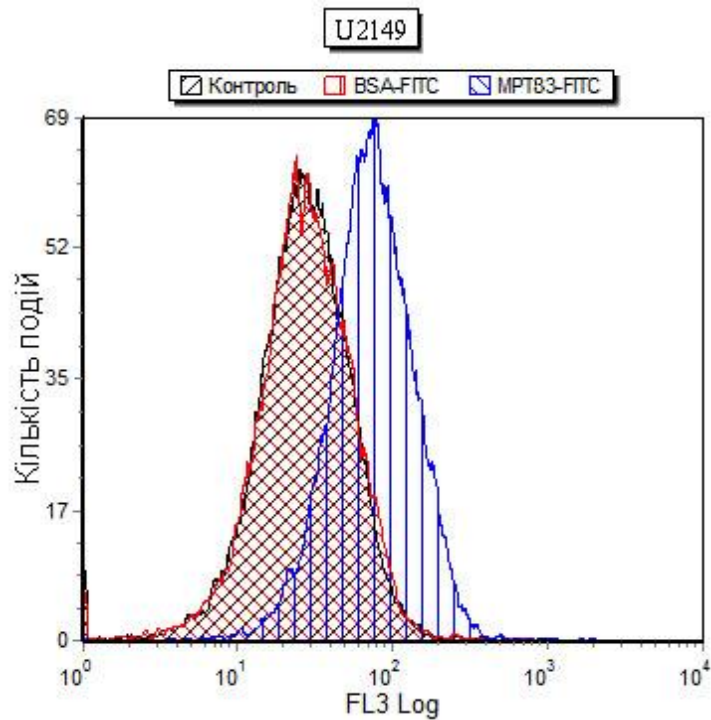


Рис. 4.10. Гістограма інтенсивності флуоресценції клітин лінії U2149, інкубованих з флуоресцентно міченим MPT83

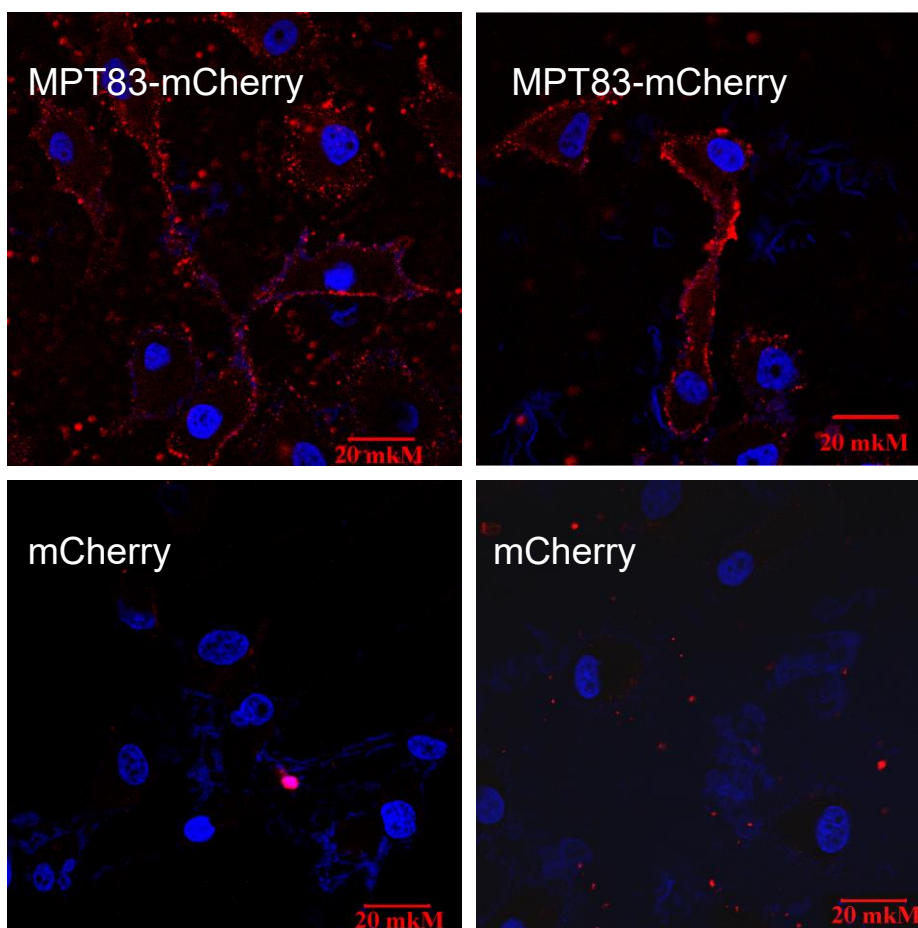


Рис. 4.11. Конфокальна мікроскопія препаратів клітин лінії U2149, інкубованих з mCherry-MPT83 та mCherry

Лінія U2149 була охарактеризована Genberg та співавторами в 1989 р. [126]. Зокрема ними було показано, що вона включає як макрофаго- так і фібробластоподібні клітини. Нами ця лінія була отримана з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Оскільки MPT83 зв'язувався не з окремою популяцією в межах лінії, як можна було очікувати, ми також забарвили клітини U2149 антитілами до МНСІІ. Було виявлено, що клітини U2149 зв'язувались з антитілами до МНСІІ, при чому знову ж таки за цим параметром не виділялось окремої субпопуляції (рис. 4.12).

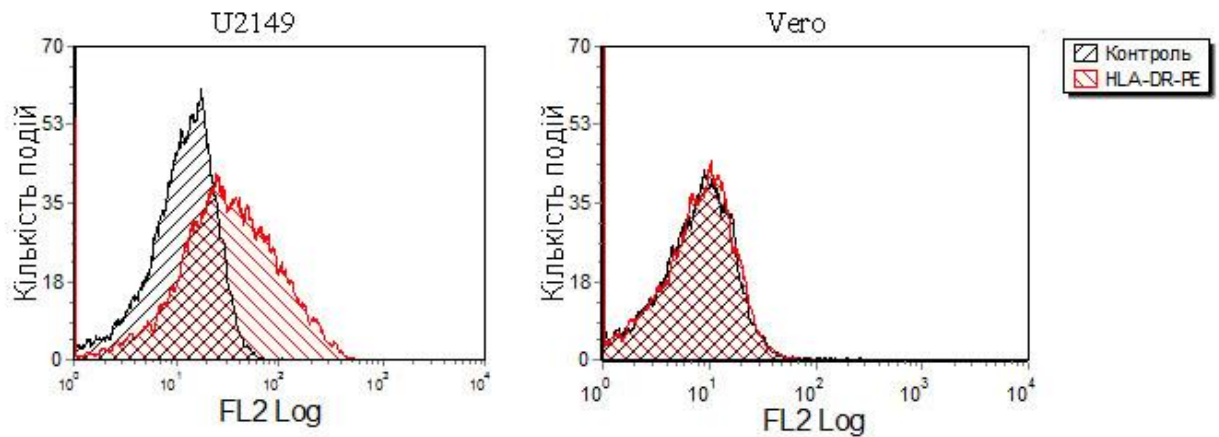


Рис. 4.12. Гістограма інтенсивності флуоресценції клітин лінії U2149, інкубованих з антитілами до МНСІІ. Для контролю використано клітини лінії Vero. Протокова цитофлуориметрія

Загалом, зараз TLR2 не розглядається як єдина можлива мішень для MPT83. Зокрема на макрофагах мишей-нокаутів за TLR2 при стимуляції MPT83 спостерігалось суттєве зростання TNF- $\alpha$ , IL-6, та IL-12, хоча й нижче ніж для макрофагів мишей дикого типу [54]. Так само блокування TLR2 антитілами знижувало, але не відміняло ефекти MPT83 [53]. Тому механізми взаємодії MPT83 з клітинами господаря залишаються не до кінця зрозумілими. Той факт, що клітини лінії U2149 так активно зв'язуються з MPT83 робить її дуже привабливою моделлю для досліджень механізмів дії цього антигена мікобактерій.

#### 4.5. Висновки до розділу

1. Виявлено, що MPT63 зв'язується з окремою субпопуляцією (10% від загального пулу) клітин селезінки миші. Не виявлено зв'язування MPT63 із клітинними лініями фібробластів та лімфоцитів миші, але виявлено, що MPT63 специфічно зв'язується з субпопуляцією високогранулярних клітин лінії гістіоцитарної лімфоми людини U937

(5% від загального пулу), ймовірно, диференційованих в бік макрофагального фенотипу.

2. Методами протокової цитофлуориметрії та конфокальної мікроскопії показано, що антиген мікобактерій МРТ83 зв'язується з поверхнею макрофагоподібних клітин лінії U2149.

Результати, представлені у даному розділі, опубліковано у власних наукових працях [157].

## РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ МРТ63 ТА МРТ83 НА АКТИВАЦІЮ, ДОЗРІВАННЯ ТА ЕНДОЦИТАРНУ АКТИВНІСТЬ ФАГОЦИТІВ

### 5.1. Дослідження впливу рекомбінантних антигенів *M.tuberculosis* МРТ63 та МРТ83 на фагоцитоз

Для дослідження процесу фагоцитозу були використанні клітин *E.coli*, трансформовані зеленим флуоресцентним протеїном, згідно протоколу, описаного в роботі Gille та співавторів [127]. Спершу даний протокол було відпрацьовано на клітинах J774 (рис. 5.1). При аналізі результатів флуоресцентної мікроскопії можна виявити, що клітини *E.coli* візуалізувалися у цитоплазмі макрофагів (рис. 5.1). При цьому кількість поглинутих бактерій була різною для різних клітин, що відображає різний рівень фагоцитарної активності.

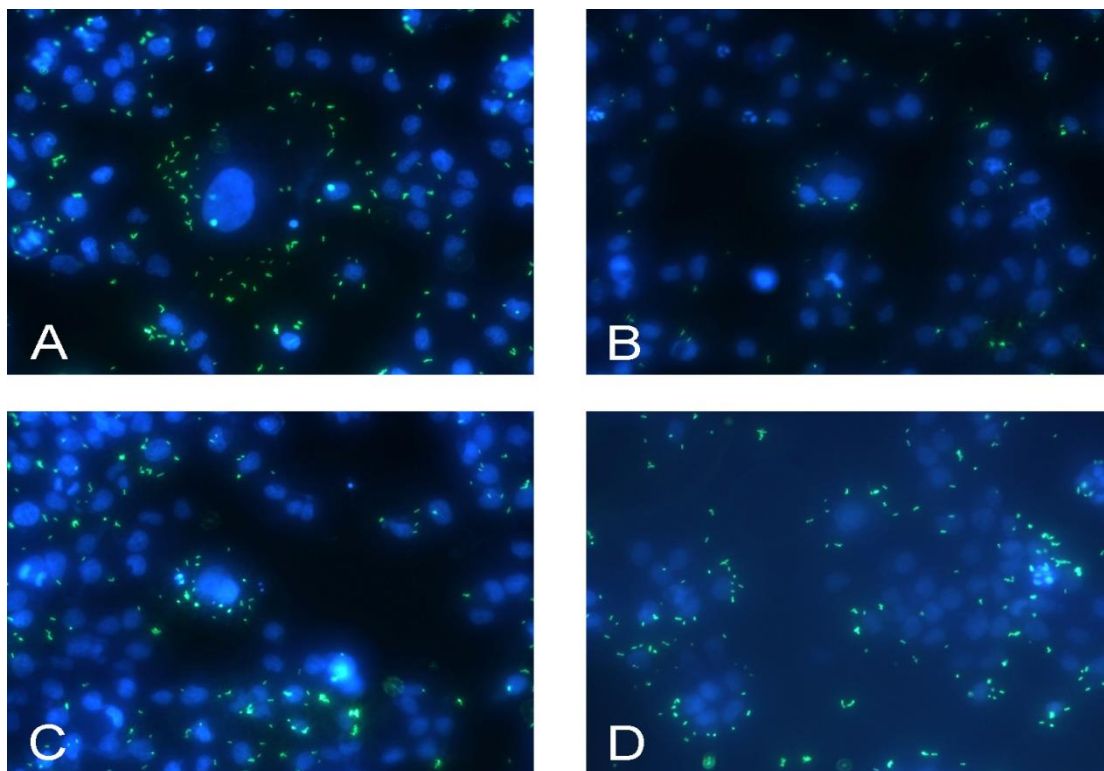


Рис. 5.1. Мікрофотографії клітин J774 після фагоцитозу *E.coli*

Надалі рівень фагоцитозу оцінювали методом протокової цитофлуориметрії, оскільки в такому випадку можна об'єктивно проаналізувати дані для великої кількості клітин.

Для визначення фагоцитарної активності до перитонеальних макрофагів на 30 хв. додавали клітини *E.coli*, так, щоб їх кількість в 100 разів перевищувала кількість фагоцитарних клітин. Як видно з рис. 5.2, після інкубації з *E.coli* можна виділити частину макрофагів, що характеризуються високим рівнем флуоресценції, а отже поглинули *E.coli*, трансформовані зеленим флуоресцентним протеїном. У трьох незалежних експериментах такі клітини становили  $10 \pm 1,7\%$  із загального пулу.

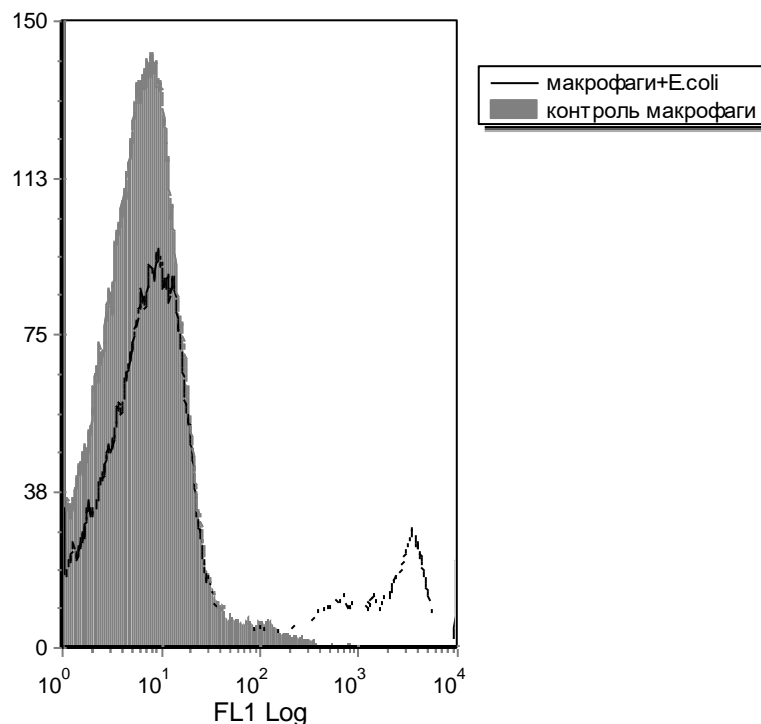


Рис. 5.2. Фагоцитарний тест з використанням клітин *E.coli*, що продукують зелений флуоресцентний білок EGFP. Серед перитонеальних макрофагів клітини, що активно фагоцитують *E.coli*, склали 10,5%, інші – 89,5%

### **5.1.1. Дослідження фагоцитозу кальцій-фосфатних наночасток кон'югованих з МРТ63 та МРТ83**

Наночастинки різної природи (на основі солей неорганічних речовин, золота, окисів металів, полімерів) широко використовуються в галузях клітинної біології, медицини для транспорту біомакромолекул, генної терапії, доставки ліків, імунізації тощо [128]. Конкретні властивості наночастинок, а саме розмір, форма, кристалічна структура, морфологія, тип поверхні, визначають хімічні і фізичні властивості наночасток та їх кон'югатів, їх стабільність, фармакокінетичні та фармакодинамічні властивості, період напівіснування (а значить і час активного функціонування та дії в організмі), активність, проникність через фізіологічні бар'єри [129].

Кальцій фосфатні наночастинки викликають інтерес у дослідників щодо їх застосування у багатьох галузях прикладної біології та медицини завдяки своїй біологічній сумісності з клітинами різноманітних організмів (адже іони кальцію та фосфору відносять до макроелементів, вони широко представлені в різних формах і сполуках в організмі людини) та біологічній активності [130]. Феномен рецептор-опосередкованого ендоцитозу і був поштовхом для розвитку направленої доставки лікарських засобів [131].

Захоплення клітиною наночастинок є результатом динамічного протистояння механізмів захоплення частинок та процесів, які протидіють цьому [132]. А отже, модифікація поверхні наночастинок різноманітними лігандами, молекули-мішені до яких представлені на тій популяції клітин, яка досліджується, сприяє активному потраплянню кон'югованих наночасток в середину клітини та вивільненню потенційних терапевтичних препаратів або експериментальних сполук, дія яких досліджується.

Дрібні наночастинки, поверхня яких модифікована амфіпатичними речовинами, легко можуть проникати через ліпідний бішар без участі в цьому процесі додаткових механізмів або рецепторних молекул [131].

Для наночасток сферичної форми характерним є «оптимальний» радіус (близько 15 нм), при якому часточки поглинаються з більшою ефективністю. Вже було доведено, що ефективність поглинання наночасток залежить від їх форми, наприклад: макрофаги – активно фагоцитуючі клітини – надають перевагу у поглинанні наночастинок невеликої сферичної або циліндричної форми, ніж більш видовженим або великим конгломератам. Це можна пояснити з точки зору еволюції їх функцій: ці імунні клітини призначені для фагоцитозу бактерій (наприклад, кокоїдної або паличковидної форми) та інших чужорідних речовин [133].

Наночастинка може потрапити в клітину різноманітними способами: це може бути фагоцитоз, піноцитоз, рецептор-опосередкований ендоцитоз або кавеолін-опосередкований ендоцитоз. Шлях поглинання залежить не лише від типу клітин, а й від властивостей самих наночасток.

Надалі захоплена наночастинка локалізується у фагосомі або ендосомі – в залежності від шляху потрапляння. З наступним злиттям фагосоми (ендосоми) з лізосоною утворюється фаголізосома, змінюється рН вмісту, від носія (наночастинки) можуть дисоціювати кон'юговані молекули білків або нуклеїнових кислот, які далі і чинитимуть дію на метаболічні процеси живої клітини [134].

Одна з проблем, що виникає під час приготування кальцій фосфатних наночасток, є можливість утворення різноманітних форм фосфату кальцію, через різне співвідношення Ca/P, а саме: аморфний кальцій фосфат  $(Ca_xH_y(PO_4)_z \cdot x \cdot nH_2O)$ , однозаміщений фосфат кальцію моногідрат  $(Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O)$ , октакальцій фосфат  $(Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O)$ , гідроксоапатит  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ , ангідрид двозаміщеного фосфату кальцію  $(CaHPO_4)$  та багато інших [135]. Варіабельність утворення CaP наночастинок залежить і від типу аніону фосфату у складі конгломератів: орто-  $(PO_4^{3-})$ , мета-  $(PO_3^-)$ , піро-  $(P_2O_7^{4-})$  або полі-  $((PO_3)_n^{n-})$  аніон.

Фагоцитоз імунокомпетентними клітинами різноманітних наночасток залежить і від типу поверхні та модифікації останніх. Наприклад, наночастки

імобілізовані протеїнами сироватки крові (альбумінами, імуноглобулінами, трансферином) активніше поглиналися альвеолярними макрофагами, ніж вільні наночастки, які оминали процес фагоцитозу та викликали запалення та фіброз у легнях піддослідних мишей при введенні інтраназально [136].

Синтезовані наночастки мінімального розміру характеризуються більшою площею поверхні, ніж великі комплекси за однакової маси. Вони характеризуються кращою проникністю через мембрани та афінністю до поверхневих рецепторів плазматичної мембрани. Тому було оптимізовано спеціальні умови для синтезу наночасток малого розміру. З літературних джерел відомо, що утворення наночасток за низьких температур сприяє перенасиченню розчину, необхідного для кристалізації, а значить, і утворення наночасток. Розмір утворених частинок зменшується на більш високих рівнях перенасичення (при цьому збільшується в'язкість розчину та зменшується рухливість розчинених в ньому молекул) за рахунок утворення ядра наночастинки. А отже, велику кількість дрібних кристалів (наночасток) можна отримати шляхом синтезу при низькій температурі [137]. Інший шлях досягнення бажаного розміру наночасток є швидкість їхнього постійного перемішування. Утворення кристалів (наночасток) меншого розміру можна досягнути помірним перемішуванням розчину вихідних компонентів для синтезу комплексів, за рахунок переривання утворення первинного ядра нуклеації наночастинки і утворення 2-гої генерації наночасток, які будуть утворювати повторне ядро, замість нашаровуватися на раніше утворене.

Наночастинки з кон'югованими антигенами було отримано шляхом сорбції протеїнів мікобактерій на кальцій фосфатні часточки, які утворювались при змішування розчинів цитрату натрію (15,6 мМ), двозаміщеного фосфату натрію (12,5 мМ) та кальцій хлориду (12,5 мМ) у співвідношенні 1,5:7,5:7,5.

За допомогою методу протокової цитофлуориметрії можна визначати різноманітні фізичні та хімічні параметри клітин або мікрочасток. Це можливо за рахунок існування численних флуоресцентних міток (FITC,

родамін, фікоеритрин, алофікоціанін тощо), які сполучають з молекулами-лігандами відповідних рецепторних молекул на поверхні клітин. Таким чином це допомагає вивчати конкретну популяцію клітин, сортувати клітини за певними фенотиповими ознаками або фізіологічним станом.

Перед проведенням протокової цитометрії клітини інкубувалися з наночастками протягом 1 год. при 37°C та 30 хв. при 4°C. Інкубація за температури 4°C проводилась для оцінки ефективності сорбції кальцій фосфатних наночастинок на поверхні клітин, в той час, як інкубація за температури 37°C дозволяла дослідити ефективність поглинання (фагоцитоз) наночастинок протягом певного періоду часу.

З результатів цитометричного дослідження, поданих на рис. 5.3 видно, що клітинами сорбувалися кальцій фосфатні наночастинки (інкубація при 4°C), які були кон'юговані з MPT63 та mCherry. Обидва типи часток кальцію мали практично однакову ефективність сорбції на поверхні клітин.

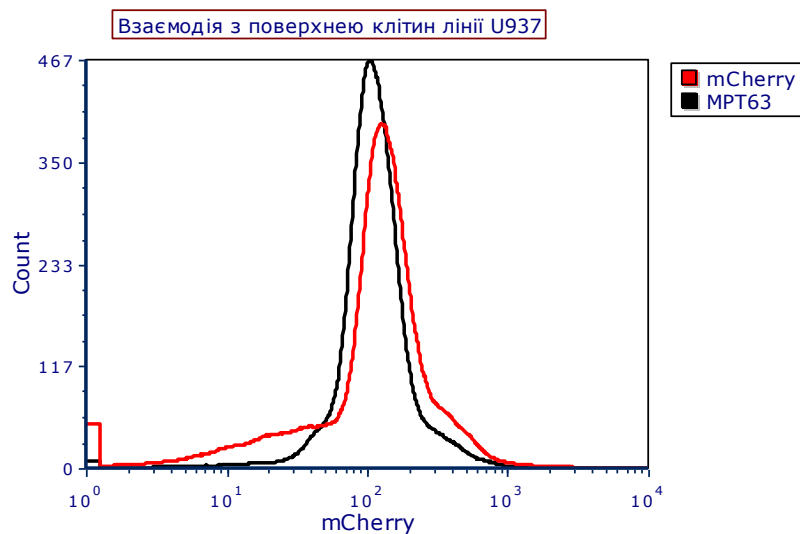


Рис. 5.3. Гістограма інтенсивності флуоресценції клітин U937 після інкубації з кальцій фосфатними наночастинками, кон'югованих з білком *Mycobacterium tuberculosis* MPT63 та червоним флуоресцентним білком mCherry

Умови, що було вибрано для інкубації клітин з міченими родаміном В протеїнами або флуоресцентними похідними антигенів мікобактерій наночастинками – 4°C та присутність азиду натрію в середовищі інкубації, відповідають вимогам блокування активного поглинання клітинами наночасток. Тому, скоріш за все, відбувалася сорбція поверхневими молекулами клітинною моделлю отриманих кальцій фосфатних наночасток.

Другий етап цього експерименту полягав у аналізі фагоцитарної активності клітин U937 за допомогою створених наночастинок, кон'югованих з мікобактеріальним антигеном МРТ63. Інкубацію клітин з міченими родаміном В CaP-mCherry та CaP-MPT63 наночастинками проводили в середовищі без азиду натрію при 37°C. Дані цитометрії (рис. 5.4) свідчать про те, що CaP-MPT63 частинки активно поглиналися моноцитами як і контрольні частки, але ефективність ендоцитозу клітинами CaP-MPT63 була вищою ( $24,6 \pm 3,9\%$ ), ніж контрольних наночастинок з mCherry.

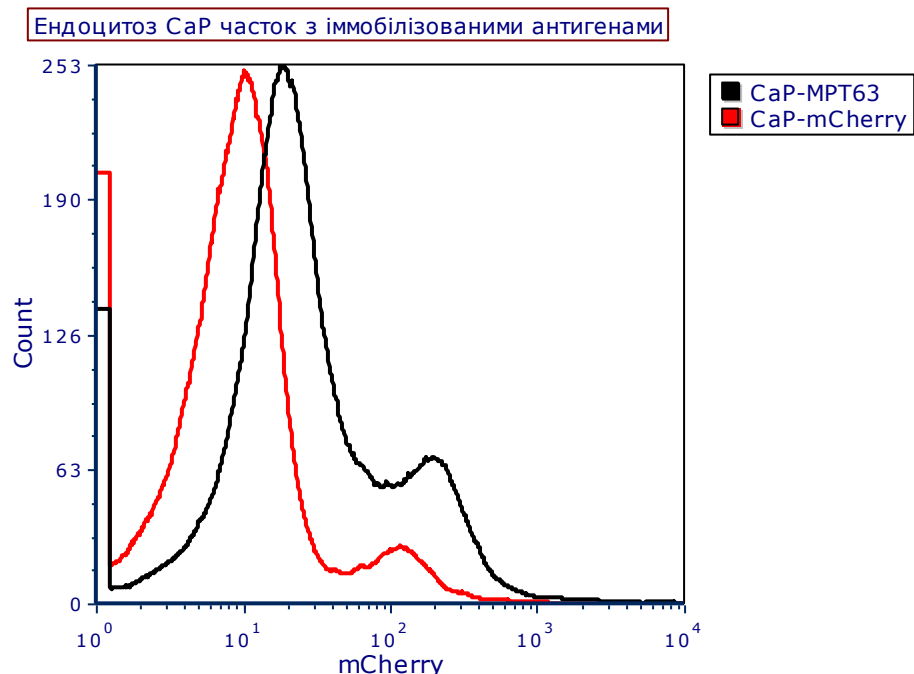


Рис. 5.4. Гістограми поглинання клітинами U937 кальцій фосфатних наночасток, кон'югованих з білками МРТ63 та mCherry

При порівнянні гістограм малого кутового світлорозсіювання, світлорозсіювання під прямим кутом та інтенсивності флуоресценції не було відмічено значних змін у розмірі та ступені бічного світлорозсіювання (гранульованості) клітин, що поглинали частки (рис. 5.5).

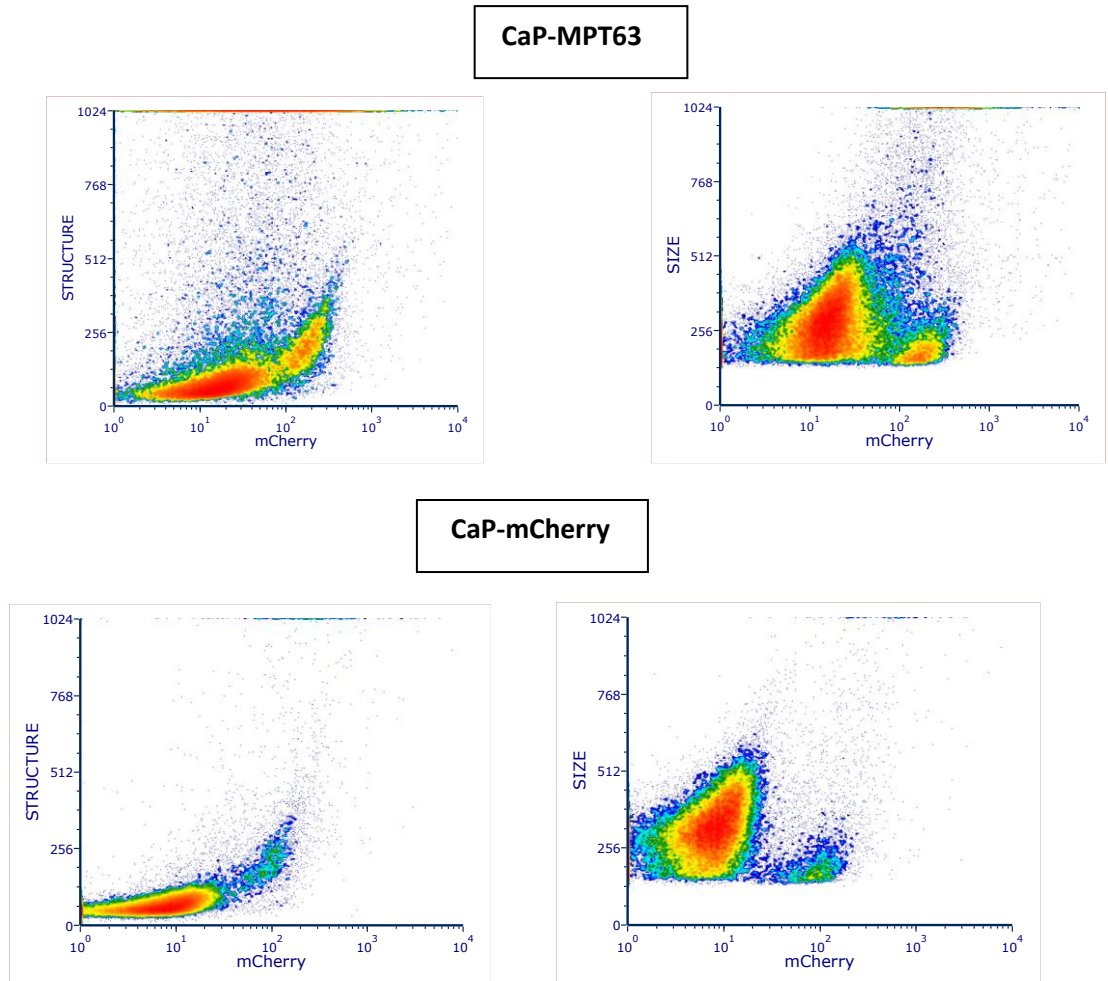


Рис. 5.5. Розподіл клітин, мічених CaP-MPT63 та CaP-mCherry в залежності від бокового (Structure) та прямого світлорозсіювання (Size)

Досить умовно можна говорити про те, що частинки з MPT63 та MPT83 поглинались інтенсивніше. Проте цей експеримент є цікавим, тому що аналіз літератури показує, що в роботах по дослідженню функцій MPT83 використовується розчинна форма цього антигену, разом з тим, нативний MPT83 є мембраннозаякореним білком і наночастинки принаймні умовно

моделюють ситуацію, що має місце при взаємодії мікобактерій з клітинами господаря.

### 5.1.2. Дослідження впливу MPT63 та MPT83 на фагоцитоз клітин *E.coli*

Після інкубації з MPT63 та MPT83 кількість макрофагів, з високою фагоцитарною активністю зростала. В трьох незалежних експериментах відсоток клітин, що активно фагоцитують після стимуляції MPT63 та MPT83, зростав майже вдвічі (табл. 1). При чому достовірних відмін при інкубації упродовж 30 хв, 1 год чи 2 год не було виявлено. Натомість, після інкубації з mCherry, відсоток клітин, що активно фагоцитують зростав не суттєво (табл.1). Відповідно на рис. 5.6 та 5.7 наведено результати фагоцитарного тесту після стимуляції макрофагів MPT63, MPT83 та mCherry, за умов інкубації з цими протеїнами упродовж 3 год.

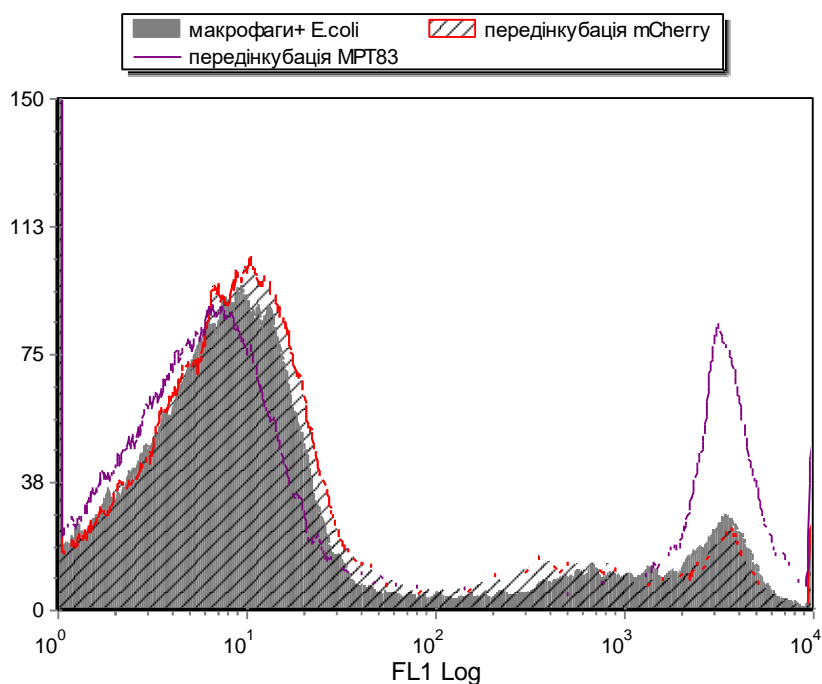


Рис. 5.6. Гістограма інтенсивності флуоресценції перитонеальних макрофагів мишей BALB/c після фагоцитарного тесту з використанням клітин *E.coli*, що продукують зелений флуоресцентний протеїн EGFP.

Відповідно, наведено рівень фагоцитарної активності макрофагами, що не інкубували з білками та за умов передінкубації з МРТ83, чи, для контролю, з mCherry (0,25 мкМ концентрація)

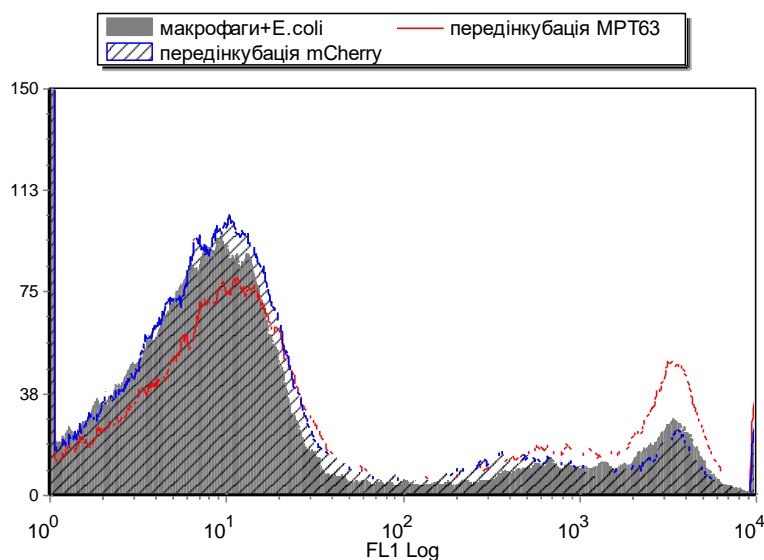


Рис. 5.7. Гістограма інтенсивності флуоресценції перитонеальних макрофагів мишей BALB/c після фагоцитарного тесту з використанням клітин *E.coli*, що продукують зелений флуоресцентний білок EGFP. Відповідно, наведено рівень фагоцитозу макрофагами, що не інкубували з протеїнами та за умов передінкубації з МРТ63, чи, для контролю, з mCherry (0,25 мкМ концентрація)

Таблиця 1

**Відносна кількість перитонеальних макрофагів миші, які активно фагоцитують *E.coli*, що трансформовані EGFP, за впливу рекомбінантних антигенів (3 год), %**

	інтактні клітини (контроль)	mCherry	MPT63	MPT83
<b>Макрофаги + <i>E.coli</i>-EGFP</b>	<b>10,5 ± 1,1</b>	<b>10,9 ± 0,79</b>	<b>19,1 ± 1,62*#</b>	<b>19,8 ± 2,1 *#</b>

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

Таким чином, стимуляція МРТ63 та МРТ83, але не контрольним антигеном, приводила до збільшення кількості перитонеальних макрофагів, здатних до активного фагоцитозу.

## **5.2. Дослідження впливу МРТ63 та МРТ83 на експресію маркерів активації макрофагів CD11b та F4/80**

CD11b ( $\beta$ -ланцюг Mac-1, також відомого як рецептор комплексу CR3) це інтегрин, що у великих кількостях представлений на активованих макрофагах та дендритних клітинах, і безпосередньо задіяний у індукції клітинної імунної відповіді, зокрема процесах фагоцитозу, цитотоксичності та міграції [138-140]. Більше того відомо, що CR3 відіграє важливу роль у процесі захоплення мікобактерій макрофагами як за антитіло-залежним, так і за антитіло-незалежним механізмом [141].

Оскільки результати з вивчення взаємодії МРТ63 із фагоцитарними клітинами дозволяли припускати, що така взаємодія має місце, ми дослідили, як впливатиме МРТ63 на експресію CD11b. Для цього як модель було використано перитонеальні макрофаги миші. Було виявлено, що після інкубації з МРТ63 протягом 24 год відсоток клітин з високим рівнем експресії CD11b зростав (табл. 2). Як контрольний білок використовували mCherry, який так само як і МРТ63 був експресований у клітинах *E.coli*, і, що не менш важливо, був виділений і очищений за тим же протоколом. Обидва білки використовували у 0,25 мкМ концентрації, при цьому об'єм білків, що додавався був однаковим. Це дозволяло перевірити можливий вплив різних бактеріальних домішок, що могли потрапити у зразок під час виділення. У трьох незалежних експериментах передінкубація з МРТ63 підвищувала відсоток клітин з високим рівнем експресії CD11b, а клітини, що передінкубувались із mCherry мало відрізнялись від інтактних (рис. 5.8). Для експерименту представленому на рис. 5.8 і табл. 2, у контролі антитілами до

CD11b забарвлювалось 31,5% клітин (не забарвлювалось 68,5%), після передінкубації з MPT63 – 47,5% клітин (не забарвлювалось 52,5%), після передінкубації з mCherry – 33,2% клітин (не забарвлювалось 66,8%). У двох інших експериментах результати були подібними. Проте, якщо час інкубації клітин з MPT63 зменшувався до 8 год і до 30 хв – ефект не спостерігався. Зміни в експресії CD11b на поверхні можуть відбуватись вже через декілька хвилин після стимуляції [142], що відбувається за рахунок його внутрішньоклітинного пулу. Оскільки після стимуляції MPT63 для зміни рівня представленості CD11b був необхідний час, вірогідно цей процес обумовлений змінами в експресії гена CD11b.

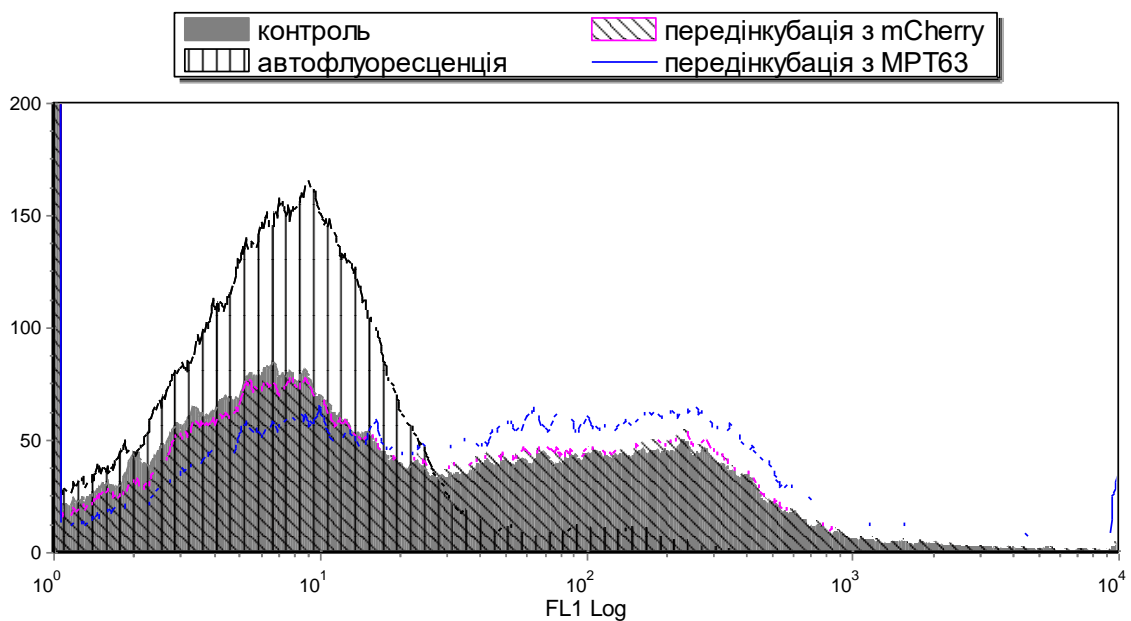


Рис. 5.8. Гістограма інтенсивності флуоресценції перитонеальних макрофагів мишей BALB/c, інкубованих з FITC-міченими антитілами до CD11b. Клітини протягом 24 год інкубували в присутності 0,25 мкМ MPT63 чи mCherry, після чого визначали рівень експресії CD11b. Контроль – інтактні клітини після інкубації з антитілами до CD11b

Аналогічний експеримент було проведено з MPT83 і отримано принципово подібні результати (рис. 5.9; табл. 2). Після 24 год інкубації з

МРТ83 кількість клітин з високим рівнем експресії CD11b була в середньому на 9% більшою, ніж серед інтактних клітин. Тобто, під впливом МРТ83 відбувалась активація макрофагів, які в пулі інтактних клітин належали до макрофагів, що перебувають у спокої.

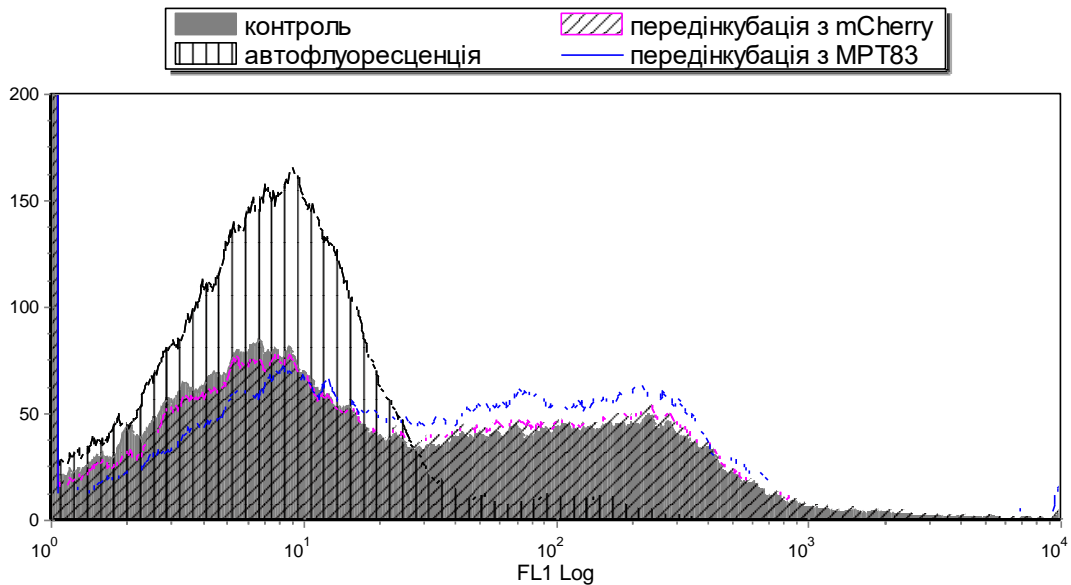


Рис. 5.9. Гістограма інтенсивності флуоресценції перитонеальних макрофагів, інкубованих з FITC-міченими антитілами до CD11b. Клітини протягом 24 год інкубували в присутності 0,25 мкМ МРТ83 чи mCherry, після чого визначали рівень експресії CD11b. Контроль – інтактні клітини після інкубації з антитілами до CD11b

Так само як і у випадку МРТ63, при інкубації з МРТ83 упродовж 30 хв, чи 8 год ефект не спостерігався. Хоча після інкубації з МРТ63 рівень клітин з високою експресією CD11b був вище, ніж після інкубації з МРТ83, загалом, вірогідно, в обох випадках підвищення експресії CD11b є наслідком активації макрофагів, зумовленої стимуляцією МРТ63 та МРТ83.

Таблиця 2

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

	інтактні клітини (контроль)	mCherry	MPT63	MPT83
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

Надалі, ми перевірили чи призводить стимуляція MPT63 та MPT83 до зростання відсотку клітин з високою експресією F4/80 – маркеру зрілих макрофагів [143]. І переконалися, що справді таке зростання має місце (рис. 5.10, 5.11; табл. 2).

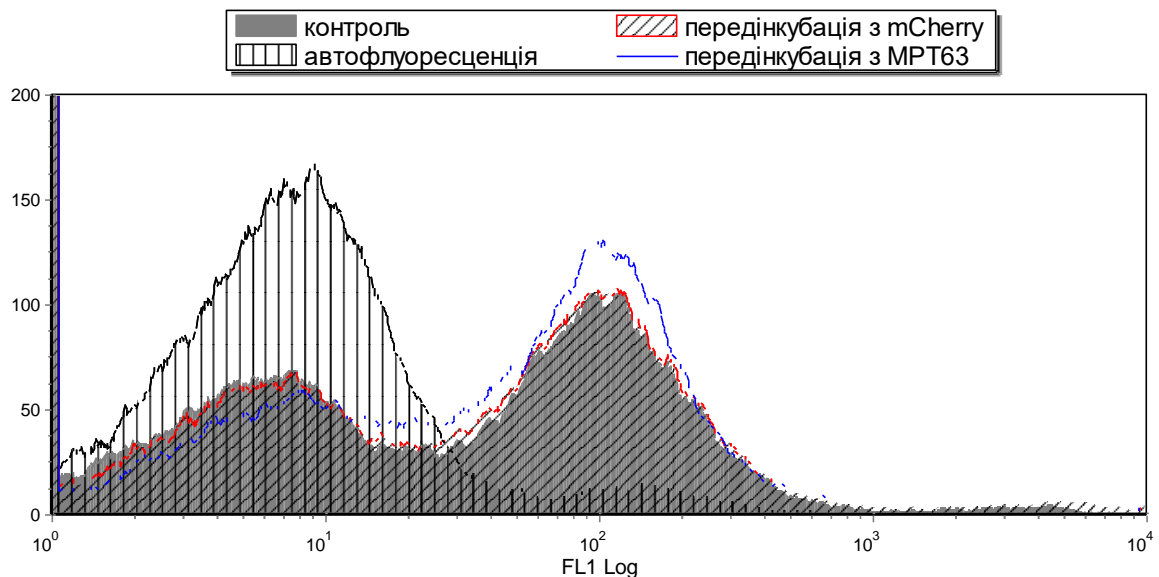


Рис. 5.10. Гістограма інтенсивності флуоресценції перитонеальних макрофагів мишей, інкубованих з FITC-міченими антитілами до F4/80. Клітини протягом 24 год інкубували в присутності 0,25 мкМ MPT63 чи mCherry, після чого визначали рівень експресії F4/80. Контроль – інтактні клітини після інкубації з антитілами до F4/80

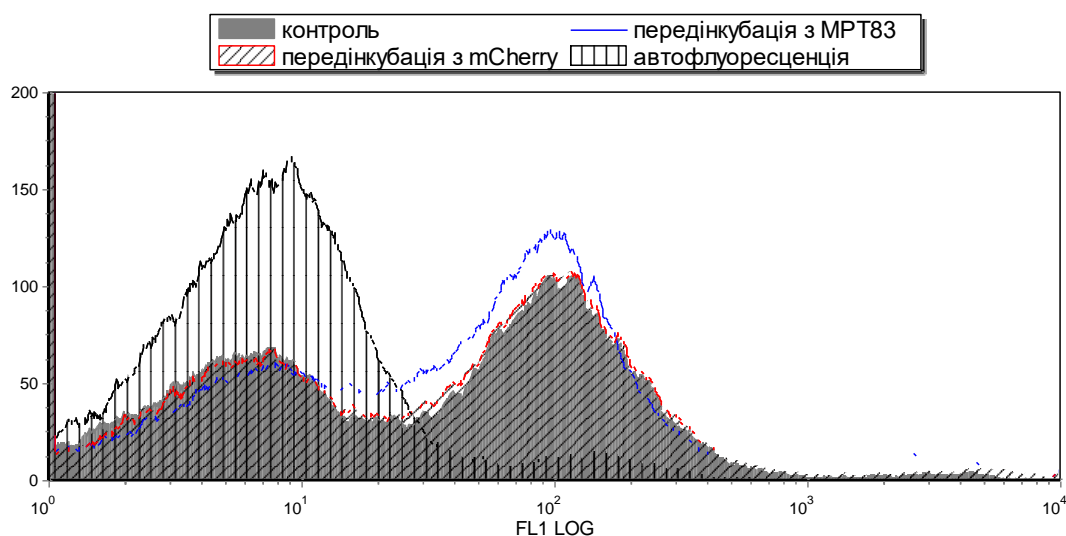


Рис. 5.11. Гістограма інтенсивності флуоресценції перитонеальних макрофагів, інкубованих з FITC-міченими антитілами до F4/80. Клітини протягом 24 год інкубували в присутності 0,25 мкМ MPT83 чи mCherry, після чого визначали рівень експресії F4/80

Тобто, при стимуляції MPT63 та MPT83 відбувається активація макрофагів. У випадку MPT83 такий ефект є цілком передбачуваним і може бути пояснений стимуляцією через взаємодію з TLR2. Проте, з отриманих результатів випливає, що MPT63 так само здатен специфічно викликати активацію макрофагів, а, отже, повинен існувати певний специфічний механізм впливу MPT63 на макрофагальні клітини.

### 5.3. Оцінка впливу антигенів *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83 на життєздатність клітин імунної системи, сполучної та епітеліальної тканин

Оскільки MPT63 є секреторним білком мікобактерій, можна було припустити, що він може впливати на життєздатність клітин-мішеней. Крім того, з метою визначення функціональної активності MPT83 останній також

був застосований як тригер для оцінки цитостатичного/проліферативного тесту. Рекombінантні протеїни MPT63 та MPT83 додавали до середовища інкубації клітин лінії J774, A431 та 3T3 (макрофагальні, епітеліальні клітини та фібробласти відповідно), які культивувались в поживному середовищі RPMI-1640, що не містило ембріональну телячу сироватку. Дію мікобактеріального антигену досліджували після 24 год інкубації з клітинами. Результати наведено на рис. 5.12, 5.13, 5.14. Наявність цитотоксичного ефекту констатували за показниками ОГ у порівнянні з контролем (інтактні клітини): якщо ОГ вмісту лунок під дією тригерів менша за ОГ контролю (інтактні клітини), мова йде про зниження проліферативної активності. Для порівняння мітогенного/антипроліферативного впливу MPT63 та MPT83, було поставлено ще два додаткових контролю: ЛПС, який є неспецифічним активатором проліферації клітин; та інертний протеїн mCherry, що був одержаним з тієї ж системи експресії і тим же методом, що і дослідні мікобактеріальні антигени.

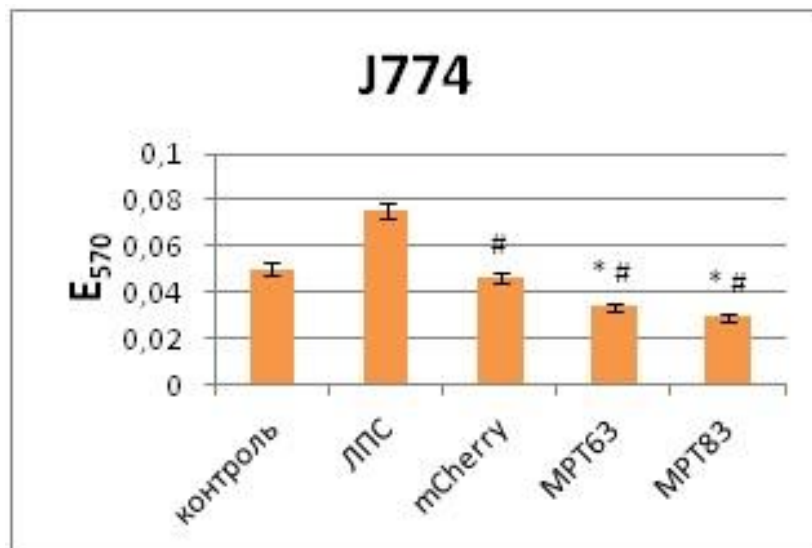


Рис. 5.12. Проліферативна активність (МТТ-тест) клітин ліній J774 за впливу рекombінантних антигенів MPT63, MPT83 і ЛПС. \*P<0,05 у порівнянні з контролем; #P<0,05 у порівнянні із стимульованими ЛПС

Одержані результати 24 год впливу антигенів МРТ63 та МРТ83 на макрофаги миші свідчать про ймовірний цитотоксичний/цитостатичний ефект на клітини природного імунітету - макрофаги.

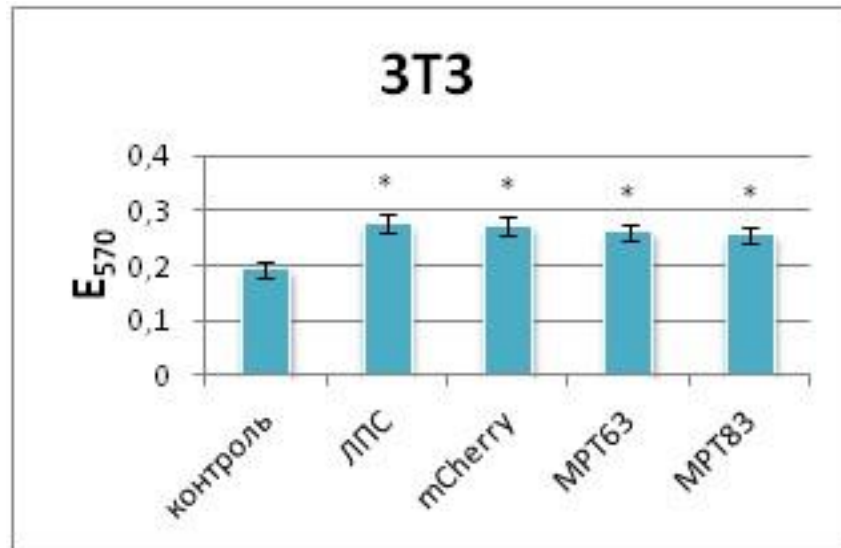


Рис. 5.13. Проліферативна активність (МТТ-тест) клітин ліній 3Т3 за впливу рекомбінантних антигенів МРТ63, МРТ83 і ЛПС. \* $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; # $P < 0,05$  у порівнянні із стимульованими ЛПС

На культурі фібробластів всі тригерні речовини продемонстрували незначну стимуляцію профілеферативної активності, ймовірно, через присутність у рекомбінатних антигенах слідів ЛПС бактерій кишкової палички, від якої були отримані дані протеїни. Раніше нами було показано відсутність цитотоксичного/мітогенного ефекту МРТ63 у суспензійній культурі клітин лінії U937 (гістіоцитарна лімфома людини). Подібні результати були отримані і з культурою епітеліального походження А431, що отримана з аденокарциноми людини.

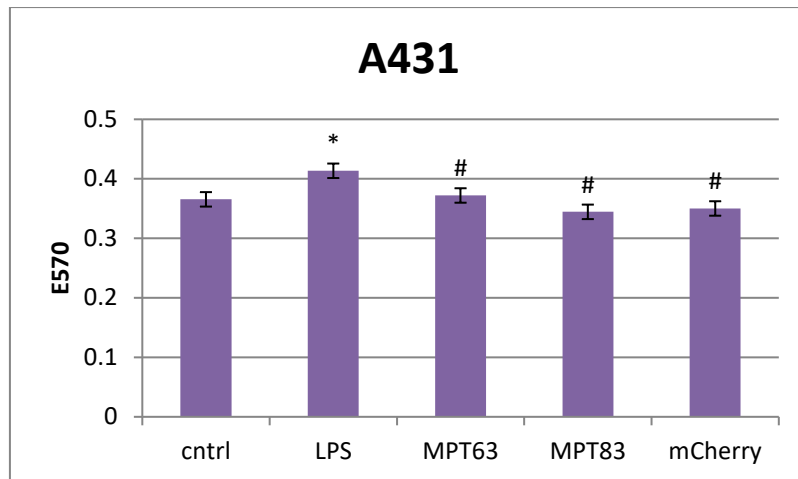


Рис. 5.14 Проліферативна активність (МТТ-тест) клітин ліній А431 за впливу рекомбінантних антигенів МРТ63, МРТ83 і ЛПС. \* $P < 0,05$  у порівнянні з контролем; # $P < 0,05$  у порівнянні із стимульованими ЛПС

#### 5.4. Дослідження апоптичного ефекту мікобактеріальних антигенів на клітинах J774, А431 та 3Т3

Однією із ознак апоптичних процесів є трансмембранний перехід негативно зарядженого фосфатидилсерину на зовнішню сторону плазматичної мембрани. За допомогою рекомбінантного анексину V злитого з зеленим флуоресцентним протеїном можна ідентифікувати популяцію клітин, що вийшла на шлях запрограмованої загибелі.

Після 24 год впливу рекомбінантних протеїнів МРТ63 та МРТ83 на клітини ліній 3Т3 (репрезентують фібробластний фенотип), а також на U937 очевидних ознак наявності популяції апоптотичних клітин не було виявлено (рис. 5.15-5.16).

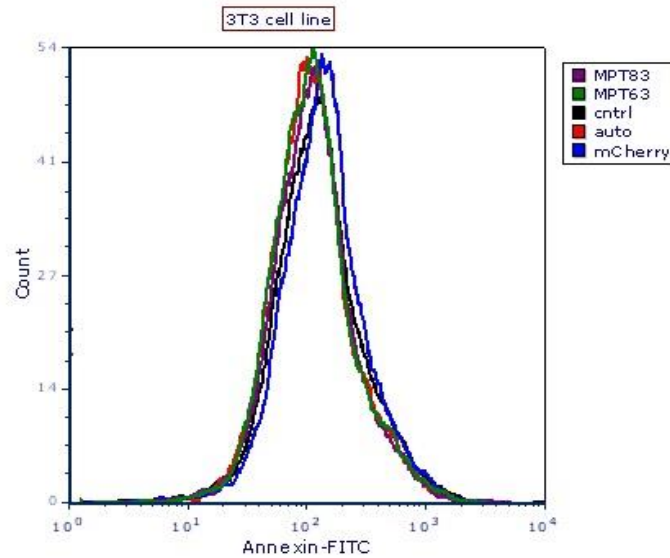


Рис. 5.15. Гістограма інтенсивності флуоресценції клітин лінії 3Т3 з анексин-EGFP після 24 год стимуляції мікобактеріальними та контрольними антигенами

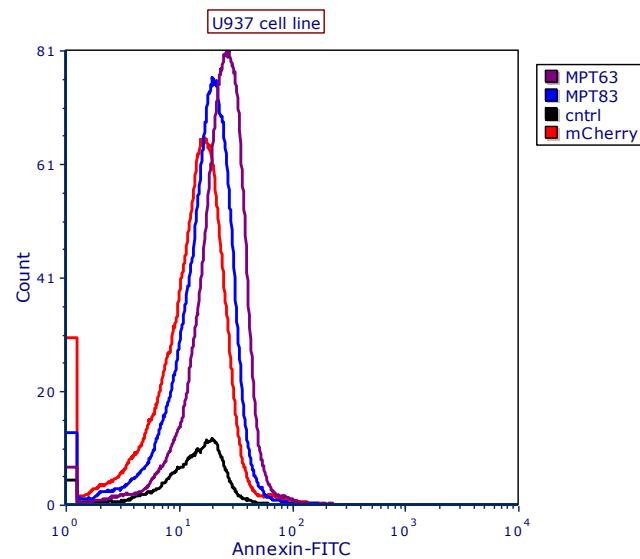


Рис. 5.16. Гістограма інтенсивності флуоресценції клітин лінії U937 з анексин-EGFP після 24 год стимуляції мікобактеріальними та контрольними антигенами

На гістограмі рис. 5.17 можна ідентифікувати зсув флуоресценції зв'язування клітин лінії J774 з анексином після впливу антигену *M.tuberculosis* MPT63, але він не значний. Ми провели порівняння впливу

цього протеїну на відповідні клітині в проліферативному МТТ-тесті, коли дія МРТ63 на макрофаги характеризувалася зниженням проліферативної активності та ймовірною цитотоксичністю в порівнянні з контролем. Тоді як за показниками протокової цитометрії, клітини J774 зв'язувались з анексином V-EGFP (на рис. 5.17 можна спостерігати зсув флуоресценції вправо), що підтверджує дані МТТ-тесту та свідчить саме про апоптотичний шлях загибелі макрофагоподібних клітин.

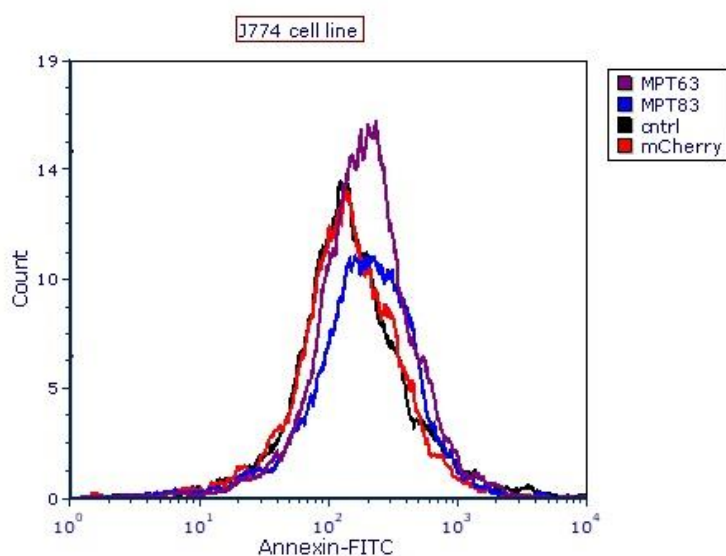


Рис. 5.17. Гістограма інтенсивності флуоресценції клітин лінії J774 з анексином-EGFP після 24 год стимуляції мікобактеріальними та контрольними антигенами

### 5.5. Оцінка пороутворювальної здатності рекомбінантних антигенів МРТ63 та МРТ83

Підвищення цитозольного кальцію шляхом виходу з депо із гранулярного ендоплазматичного ретикулуму або потрапляння із зовнішнього середовища інкубації може спричинити активацію внутрішньоклітинного сигналіngu. Тригером може бути сигнал від взаємодії лігандів із специфічними рецепторами на поверхні клітин, в тому числі і після стимуляції рекомбінантними мікобактеріальними антигенами.

Додавання іономіцину, сильного  $\text{Ca}^{2+}$  іонофору, викликало аномалію драматичного збільшення внутрішньоклітинної концентрації  $[\text{Ca}^{2+}]$  в клітинах U937, яка знижується в присутності ЕДТА (хелатор  $\text{Ca}^{2+}$ ), що підтверджує аналіз специфічності експерименту. Обробка клітин U937 рекомбінантними антигенами *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83 10мкМ концентрацією (51-600 сек та 1200-1800 сек) не викликала підвищення внутрішньоклітинного  $[\text{Ca}^{2+}]$ , рівень флуоресценції залишався незмінним (рис. 5.18).

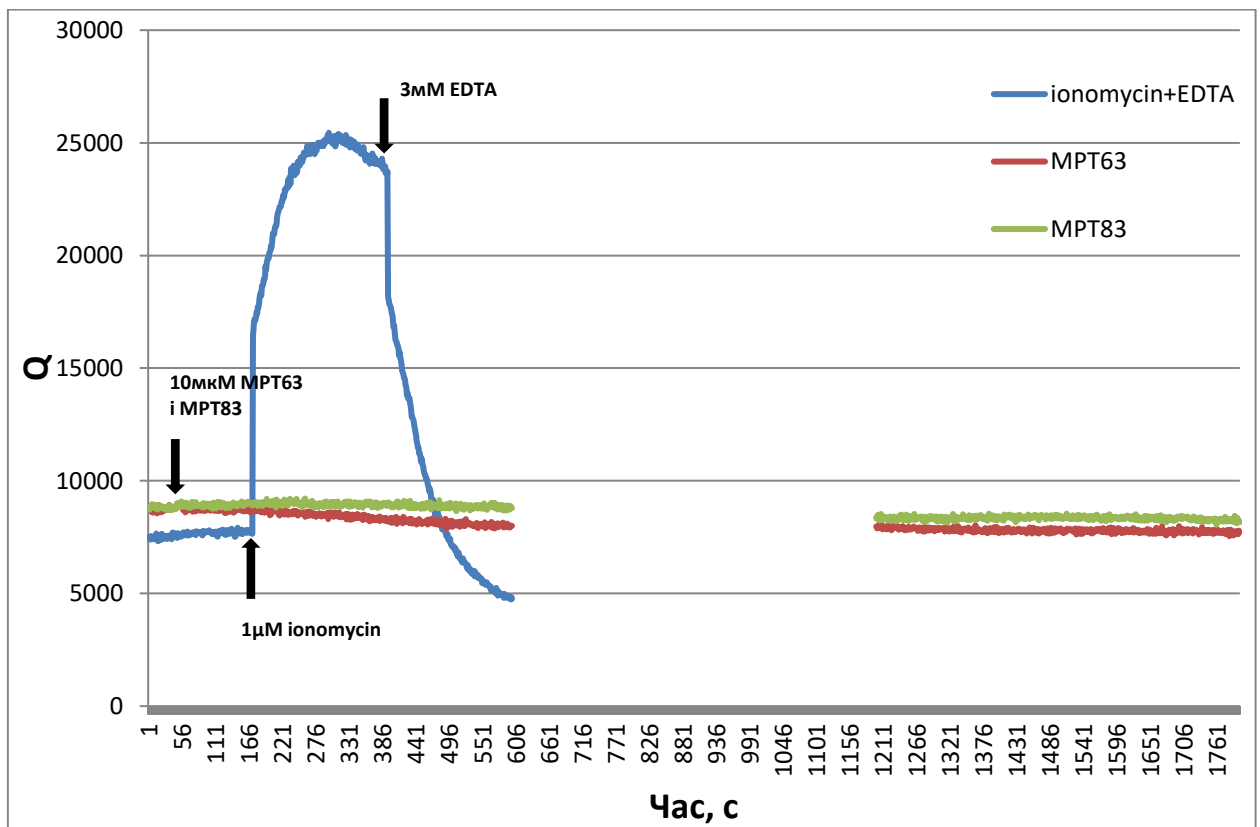


Рис. 5.18. Спектри збудження та флуоресценції  $\text{Ca}^{2+}$  чутливого флуоресцентного зонда Fluo-4-AM у позитивному (1мкМ іономіцин) та негативному (3мМ EDTA) контролі та в умовах взаємодії клітин з мікобактеріальними антигенами в часі

Таким чином можна стверджувати, що за результатами спектрофлуориметрії зміни умовних одиниць флуоресценції інтактних клітин U937 та тих, що були в середовищі інкубації з МРТ63 та МРТ83, не відбувається, а, отже, відповідні мікобактеріальні антигени не характеризуються жодними пороутворювальними властивостями.

### **5.6. Активність матричних металопротеїназ у кондиціонованому середовищі J774 після стимуляції МРТ63 та МРТ83**

Ензими сімейства матричних металопротеїназ (ММП) відіграють важливу роль у багатьох процесах за норми та патології, в тому числі і в такій імунній реакції як формування гранульоми [144]. ММП належать до родини ендопептидаз, що відповідають за руйнування компонентів позаклітинного матриксу, таких як колаген та протеоглікани, відіграють важливу роль при міграції лейкоцитів та ремодулюванні тканин [145].

Ми припустили, що тригерна дія мікобактеріальних антигенів МРТ63 та МРТ83 на клітини імунної системи потенційно може призводити до активації чи збільшення експресії ММП. У ряді робіт показано, що розвиток гранульом при мікобактеріальній інфекції супроводжується посиленням експресії ММП-2 та, особливо, ММП-9. [146] Завданням цього етапу було дослідити можливу зміну желатиназної активності ферментів у кондиціонованому середовищі потенційних мішеней мікобактеріальних антигенів – макрофагів.

Показано, що 24 год інкубація клітин із МРТ63 та МРТ83 (0,25 та 1,5 мкМ) супроводжувалась посиленням желатиназної активності ферментів у середовищі культури клітин J774 (рис. 5.19). Більш того, не було виявлено різниці між зростанням активності ММП-9 у пробах після передінкубації 0,25 та 1,5 мкМ МРТ63. Разом з тим, лише після інкубації з 0,25 мкМ МРТ83, а не з 1,5 мкМ відбулось підвищення желатиназної активності. Рівень желатиназної активності ММП у середовищі інтактних клітин без ФБС та

стимульованих mCherry не відрізнявся. Позитивним контролем слугувало середовище клітин, що росли у RPMI-1640 у присутності 10% ФБС.

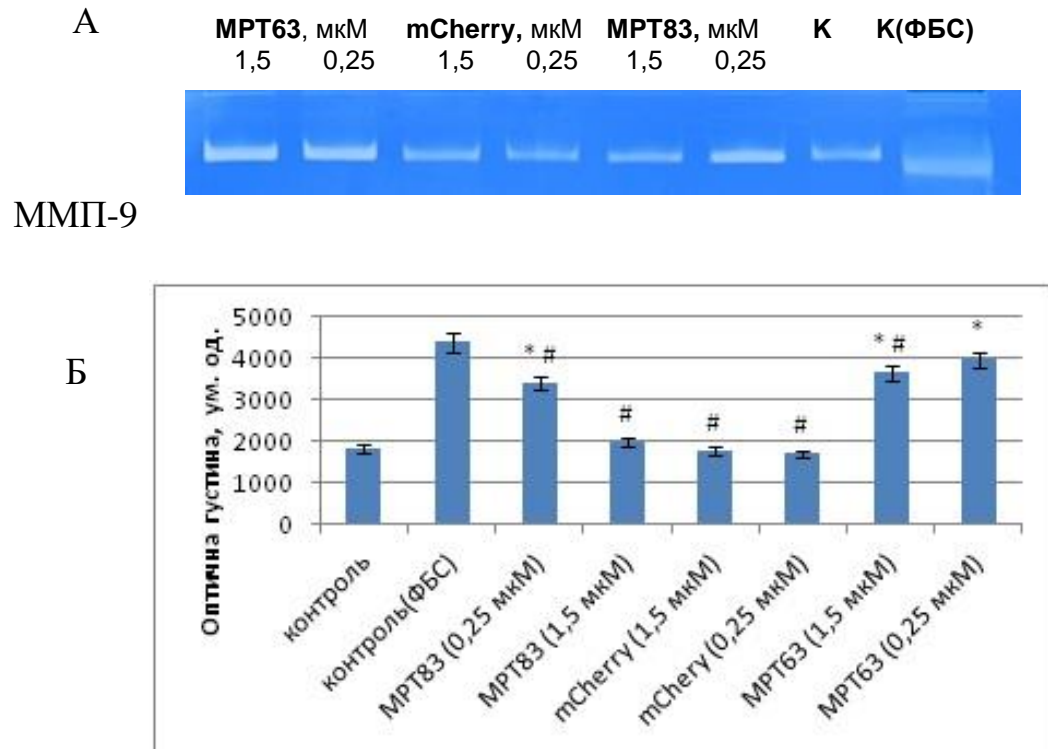


Рис. 5.19. Ензим-електрофореграма зразків кондиційованого середовища клітин лінії J774 стимульованих MPT63, MPT83 та mCherry (А). Відносний вміст ММП-9 у кондиційованому середовищі за умов впливу рекомбінантних антигенів. Контроль – нестимульовані клітини J774 без ФБС; контроль(ФБС) – нестимульовані клітини J774, середовище містило 10% ФБС. \* $P \leq 0,05$  у порівнянні з контролем; #  $P \leq 0,05$  у порівнянні з контролем(ФБС) (Б)

З літературних джерел відомо, що при розвитку інфекції у мишей спостерігається посилена експресія ММП, тому ми припустили, що ці антигени можуть брати опосередковану участь у видозміні показклітинного матриксу при формуванні гранульом. Крім того, мішенню їх дії можуть бути

також епітеліальні клітини або фібробласти, для яких також характерна секреція ММП.

### **5.7. Вивчення впливу мікобактеріального антигену MPT63 на сигнальну трансдукцію MAP кінази ERK1/2 та ядерного фактору κВ**

Взаємодія деяких мікобактеріальних антигенів з рецепторами на поверхні клітин призводить до активації тирозинкіназної активності відповідних цитоплазматичних доменів рецептору та протеїнів-партнерів.

Відомо, що фосфорилування MAP кінази ERK1/2, яка є відповідальною за активацію макрофагів та контроль розвитку внутрішньоклітинного патогену, зростає під дією антигенів *M.tuberculosis* ESAT-6 та Ag85B [147].

Групою дослідників було продемонстровано, що rMPT83 через TLR2 залежний шлях впливає на підвищення активності різних MAP кіназ. Так було показано зростання активної фосфорильованої форми p38 та ERK1/2 на 30 хв після стимулювання цим антигеном клітин RAW264.7. TLR-2 залежний шлях впливу rMPT83 було доведено з використанням антитіл до різних класів TLRs: антитіла, специфічні до TLR-2, блокували дію мікобактеріального антигену, про що свідчить низький рівень активованих вищезгаданих MAP кіназ [ 148].

Ми припустили, що секреторний протеїн мікобактерій MPT63 також може впливати на концентрацію ERK1/2 у цитопламі активованих макрофагів. Але результати вестерн блот аналізу свідчать, що 24 год стимуляція клітин лінії J774 мікобактеріальним антигеном MPT63 (0,25 мкМ) не змінювала рівні фосфорильованої форми кінази ERK1/2 (p44/p42) в цитоплазматичній фракції у порівнянні з інтактними клітинами (рис 5.20).

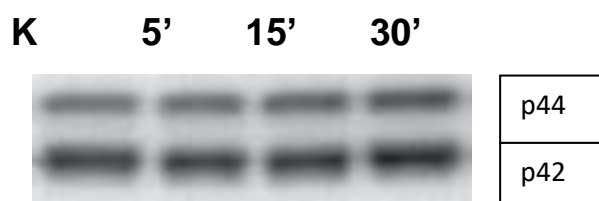


Рис. 5.20. ECL-блотинг цитоплазматичних фракцій клітин лінії J774. Ідентифікація p44/p42 (*Thr202/Thr204*) MAP кінazi ERK1/2 у часі

Відомо [53, 54], що rMPT83 сприяє транслокації регуляторної субодиниці транскрипційного фактору NF-κB до ядра. Цей транскрипційний фактор важливий для транскрипції генів прозапальних цитокінів і ко-стимуляторних молекул. Промоторні ділянки генів для синтезу прозапальних цитокінів IL-12 p40 та TNF-α містять сайти для зв'язування NF-κB [149]. Було показано, що локалізація p65 субодиниці NF-κB в ядрах стимульованих rMPT83 клітин відбувається після 15 хв індукції ліпопротеїном, але через годину рівень регуляторної субодиниці в ядрах зникає. В контрольних клітинах, не стимульованих мікобактеріальним білком MPT83, p65-субодиниця була локалізована переважно в цитоплазмі [53]. За нашими даними секреторний антиген мікобактерій MPT63 сприяв деактивації NF-κB шляхом зниження рівнів p65-субодиниці в ядрах клітин, вже починаючи з 20 хв, наслідком чого може бути інгібування транскрипції прозапальних факторів і, як результат, сприяння апоптичних ефектів у макрофагах (рис. 5.21). Апоптичні ефекти MPT63 на клітинах J774 були показані в експерименті з взаємодією анексин V – EGFP з плазматичною мембраною клітин після тригерної дії MPT63.

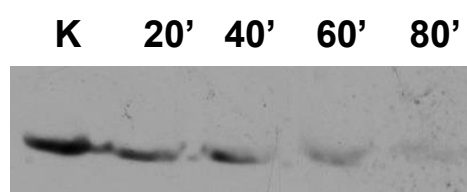


Рис. 5.21. ECL-блотинг ядерних фракцій клітин лінії J774. Ідентифікація субодиниці p-NF-κB p65 (*Ser 311*) у часі

## 5.8. Висновки до розділу

1. Показано здатність білків мікобактерій MPT63 та MPT83 стимулювати фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів миші.

2. Показано, що після інкубації з MPT83 та MPT63 протягом доби кількість макрофагів з високим високим рівнем експресії активаційних маркерів CD11b та F4/80 зростає, що свідчить про здатність цих протеїнів індукувати активацію макрофагів.

3. Виявлено, що за інкубації з рекомбінантним MPT63 в ядрах клітин J774 знижуються рівні р65 субодиниці NF-κB вже з 20 хв.

Результати, представлені у даному розділі, опубліковано у власних наукових працях [154, 157] та пройшли апробацію на:

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

3. 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.

## РОЗДІЛ 6 ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МІКОБАКТЕРІАЛЬНИХ АНТИГЕНІВ ТА ОСОБЛИВОСТЕЙ ГУМОРАЛЬНОЇ ВІДПОВІДІ

### 6.1. Експресія та порівняльна характеристика отриманого злитого рекомбінантного протеїну МРТ63-МРТ83 (повнорозмірний)

З метою попереднього аналізу наявності злитого протеїну МРТ83-МРТ63 у лізаті бактерій-продуцентів, білок виділяли з 1 мл культури *E.coli*, яку вирощували протягом 4 годин за інтенсивності аерації 250 обертів на хвилину при температурі 30° С до моменту досягнення значення оптичної густини (при довжині хвилі 600 нм) від 0,3 до 0,5 у присутності індуктора IPTG. Отриманий осад клітин аналізували на наявність білка у розчинній або нерозчинній фракціях за допомогою електрофоретичного розділення. Порівняльний аналіз фракцій лізатів бактерій-продуцентів отриманого злитого протеїну подано на рис. 6.1.

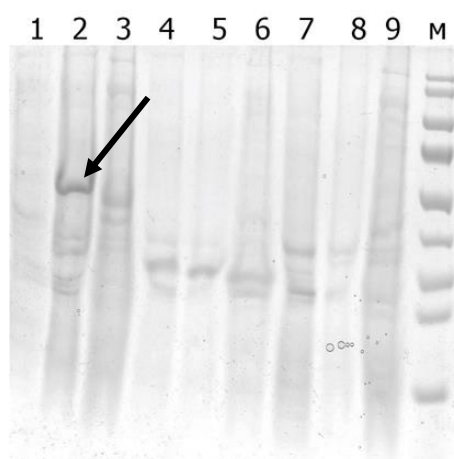


Рис. 6.1. Результати електрофоретичного розділення лізатів клітин бактерій-продуцентів при проведенні аналітичної експресії цільового антигену МРТ83(повнорозмірного)-МРТ63 (1-3), МРТ63-МРТ83(фрагмент

115-220aa) (4-6), (1,4 – нерозчинна фракція, 2,5 – розчинна фракція, 3,6 – тотальний лізат клітин; М – маркери молекулярної маси. Стрілкою вказано продукт, що відповідає молекулярній масі цільового протеїну МРТ83(повнорозмірний)-МРТ63

Таким чином отримана генетична конструкція *pET28a-tpt83(повнорозмірний)-МРТ63* давала можливість експресії цільового функціонального продукту у нерозчинній фракції (тільця включення). Проте, головною метою отримання злитого протеїну було створення антигенної молекули, що складається із двох антигенних компонент – повнорозмірного МРТ83 та МРТ63. Окрім того, новостворений протеїн характеризується й тим, що обидві антигенні складові не лише повнорозмірні, але і вбудовані в плазмідну конструкцію так, що між ними вставлений спейсер (у трансляційному варіанті поліпептидний ланцюг довжиною 8 амінокислотних залишків), який може впливати на їх фолдинг в процесі біосинтезу. Натомість отриманий нами раніше злитий протеїн МРТ63-МРТ83(115-220) не містив у своїй структурі спейсерного поліпептидного ланцюга. Відсутність спейсерної ділянки у структурі МРТ63-МРТ83(115-220) може негативно впливати на фолдинг протеїну та, як наслідок, обмежувати експонування діагностично важливих епітопів у структурі молекули. З метою проведення порівняльної характеристики антигенних властивостей протеїнів МРТ63-МРТ83(115-220) та МРТ83(повнорозмірний)-МРТ63 було використано твердофазний ІЕА із застосуванням моноклональних антитіл до N-кінцевої ділянки молекули повнорозмірного МРТ83 *M.tuberculosis*. Результати ІЕА вказують на здатність моноклональних антитіл до N-кінцевої ділянки молекули повнорозмірного МРТ83 специфічно розпізнавати рекомбінантний антиген МРТ83(повнорозмірний)-МРТ63. Натомість, рекомбінантний антиген на основі вкороченої форми МРТ83 - МРТ63-МРТ83(115-220) не розпізнавався зазначеними моноклональними антитілами

(рис. 6.2). Таким чином, наявність додаткової N-кінцевої ділянки у структурі МРТ83(повнорозмірний)-МРТ63 робить його більш привабливим та перспективним антигеном для серодіагностики.

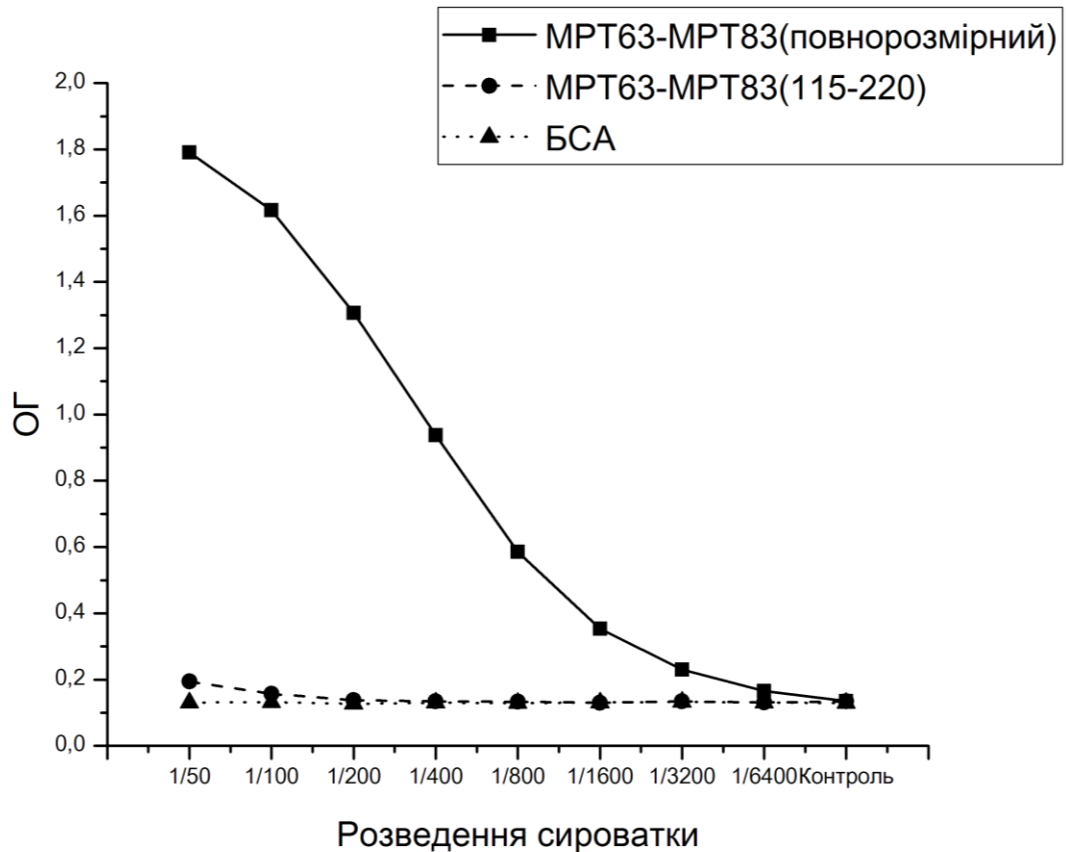


Рис. 6.2. Графічна залежність результатів розпізнавання отриманого рекомбінантного білка МРТ83(повнорозмірний)-МРТ63 моноклональними антитілами до N-кінцевої ділянки МРТ83 у порівнянні із вкороченою формою рекомбінантного антигену МРТ63-МРТ83(115-220). В якості контролю на специфічність роботи тест-системи було використано БСА. ОГ - оптична густина, виміряна у двопробеному режимі при довжинах хвилі 450 та 620 нм

## 6.2. Варіабельність розпізнавання антигенів *M.tuberculosis* поліклональними та scFv антитілами миші

Важливим етапом для створення нового діагностикуму на основі ІЕА є підбір оптимальної високоімуногенної субстанції для специфічного, точного та чутливого визначення антитіл до збудника.

Імунізація лабораторних тварин мікобактеріальними протеїнами МРТ63, МРТ83, їх еквімолярною сумішшю та злитим протеїном МРТ83-МРТ63 показала суттєво різну гуморальну відповідь до введених імуногенів (рис 6.3).

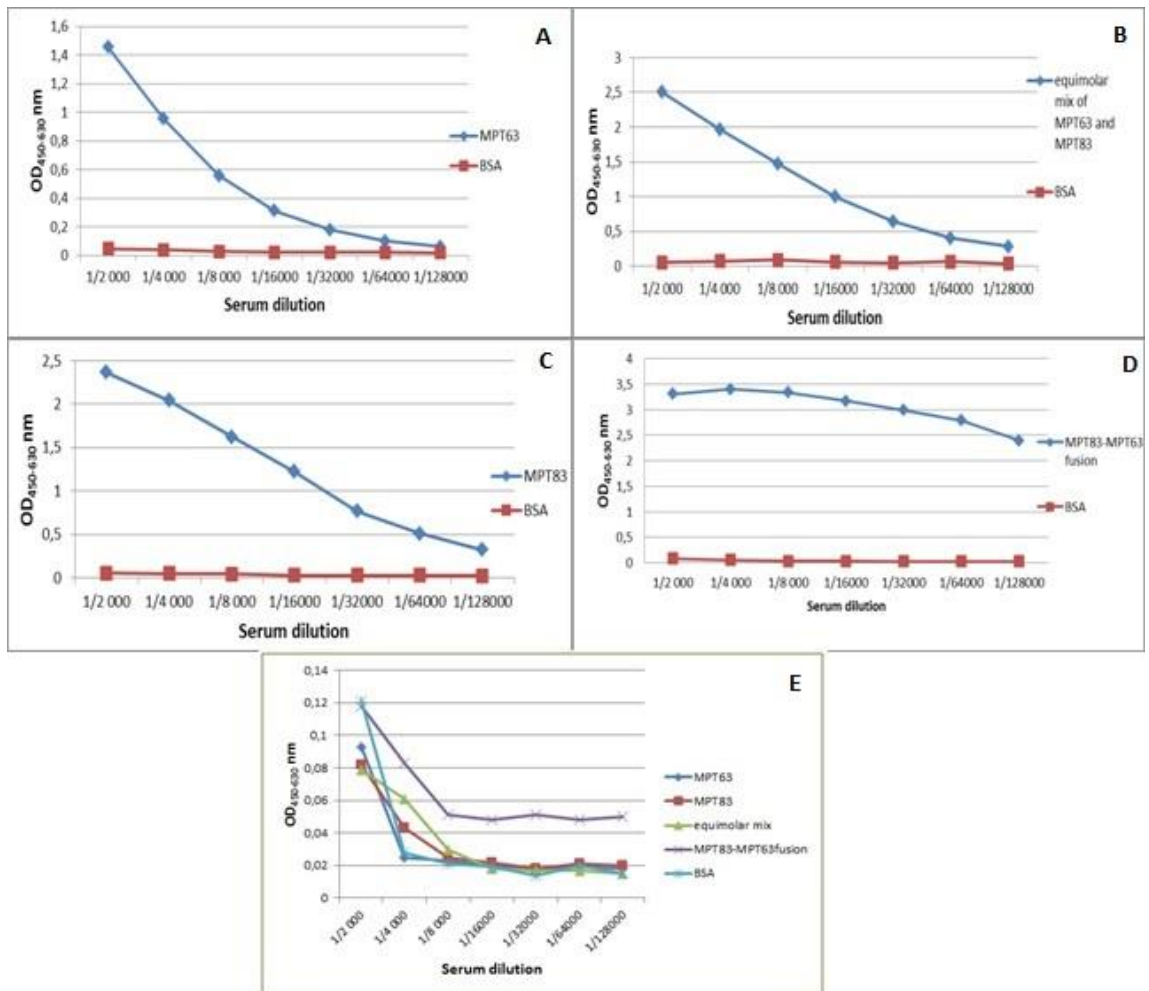


Рис.6.3. Рівень IgG до цільових рекомбінантних антигенів МРТ63 (А), коктейлю індивідуальних протеїнів МРТ63 + МРТ83 (В), МРТ83 (С), злитого протеїну МРТ83-МРТ63 (D) в сироватках імунізованих мишей та сироватках тварин до імунізації (Е)

Сироватки крові тварин (n=10 на кожну комбінацію імуногену та контроль) одержували на 35 добу після першої імунізації.

Для кожного антигену рівні сироваткових антитіл оцінювали, використовуючи величину cut off на основі індексу оптичної щільності (Optical density index, ODI), співвідношення між ОГ, отриманим для зразків досліджуваної сироватки, зібраних після імунізації, та ОГ, отриманого для зразків сироватки, зібраних з тієї ж тварини до імунізації [150]. Оптимальне розведення в сироватці було обрано за 1:16 000. Найнижчі титри антитіл були виявлені проти MPT63 (ODI  $\geq$  15,6), вищі - проти злитого протеїну MPT83-MPT63 (ODI  $\geq$  66,1). Анти-MPT83 та анти-(суміш MPT63 + MPT83) сироватки демонструють практично однакові показники (ODI  $\geq$  55,4) (рис. 6.4).

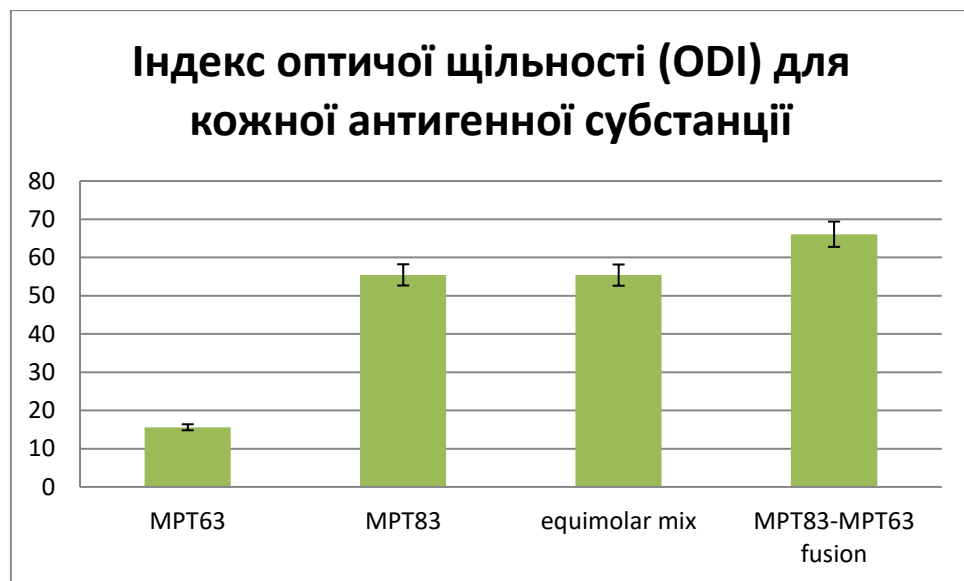


Рис. 6.4. ODI (індекс оптичної щільності) для кожної антигенної субстанції.  $ODI = OD_{(postimmunization)} / OD_{(preimmunization)}$

Мікобактеріальні антигени MPT63 є секреторним протеїном, а MPT83 - асоційований з клітинною стінкою бацил. Отримані нами рекомбінантні аналоги цих антигенів потенційно можуть характеризуватись перехресною реактивністю через однакову експресійну систему протеїнів *E. coli*. Окрім того, всі імуногени мають полі-His таг, що використовується для очищення

антигенів методом метал-афінної хроматографії. Також вважається, що внаслідок забруднення протеїнових елюатів компонентами *Escherichia*, рекомбінантні антигени можуть характеризуватися перехресними реакціями до різних типів антисироваток.

Було доведено, що антигени *M.tuberculosis* МРТ83 та МРТ63 не розпізнаються анти-МРТ63 (ОГ  $0,056 \pm 0,02$ ) та анти-МРТ83 (ОГ  $0,027 \pm 0,014$ ) сироватками відповідно (рис. 6.5).

Крім того, було доведено вирішальну роль МРТ83 для химерного протеїну МРТ83-МРТ63 та еквімолярної суміші антигенів у імунній відповіді піддослідних тварин (рис. 6.5): анти-МРТ83-МРТ63 (ОГ  $3,96 \pm 0,037$ ) та анти-(суміш МРТ63+МРТ83) (ОГ  $3,123 \pm 0,049$ ) сироватки характеризується високим рівнем IgG проти антигену МРТ83, ніж до МРТ63 (ОГ  $2,536 \pm 0,05$  та  $0,487 \pm 0,011$  для анти-МРТ83-МРТ63 злитого та анти-(суміш МРТ63+МРТ83) сироваток відповідно). Подібні експерименти проводились для виявлення всіх типів антигенів та їх комбінацій з різними сироватками (рис. 6.5).

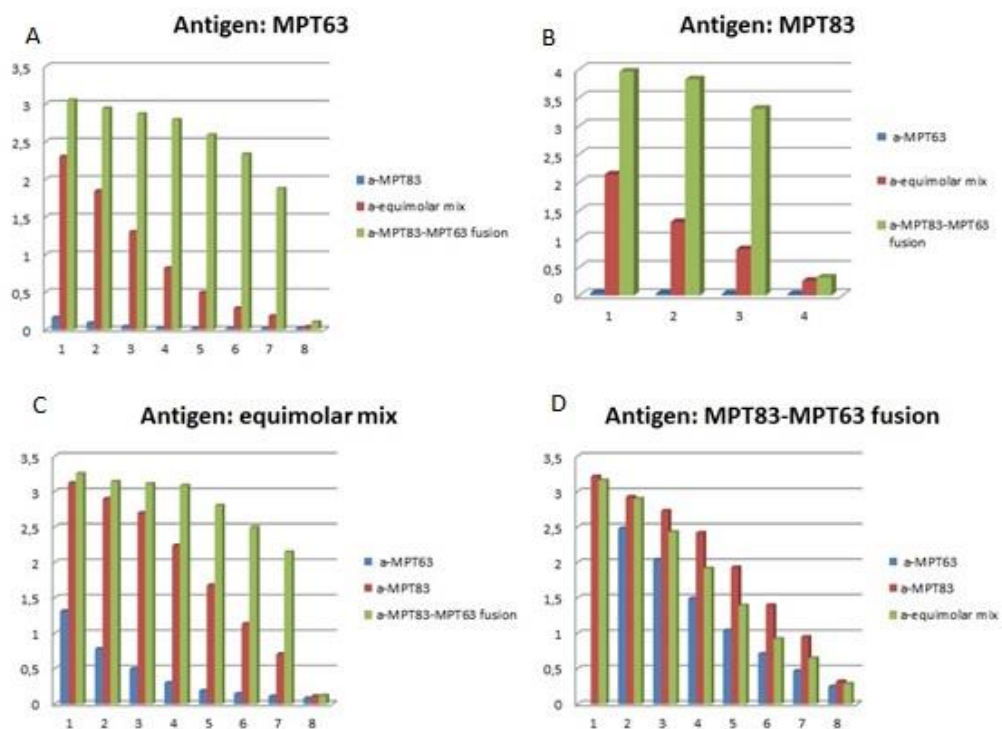


Рис. 6.5. Результати перехресної реактивності між чотирма типами антигенних речовин (А-МРТ63, В-МРТ83, С- (суміш МРТ63 + МРТ83),

злиття D-MPT83-MPT63) з усіма типами анти сироватки за виключенням власних

Химерний антиген на основі фасциклінподібного домену MPT83 (MPT83 FLD115-220aa) та MPT63 був отриманий раніше та був використаний для розробки ефективної діагностики туберкульозу для ВРХ [122].

На відміну від злитого антигену MPT83(повнорозмірного)-MPT63, який використовувався для цих експериментів, його неповний аналог не зберіг первинну структуру протеїну та, як результат, характеризується стерично обмеженим діапазоном серологічно важливих детермінант обох антигенів. В результаті, фасцикліновий домен MPT83, злитий з MPT63, не містив усіх серологічно важливих детермінант нових синтезованих протеїнів MPT83 (повнорозмірного)-MPT63. Згідно з рис 6.6, А, цей антиген, як і у випадку з повнорозмірним MPT63-MPT83 (рис. 6.6, В), краще розпізнавався анти-MPT83-MPT63 сироваткою, тоді як анти-MPT63 сироватка краще розпізнавала злитий антиген на основі короткого аналогу MPT83, а анти-MPT83 сироватка - MPT83(повнорозмірний)-MPT63.

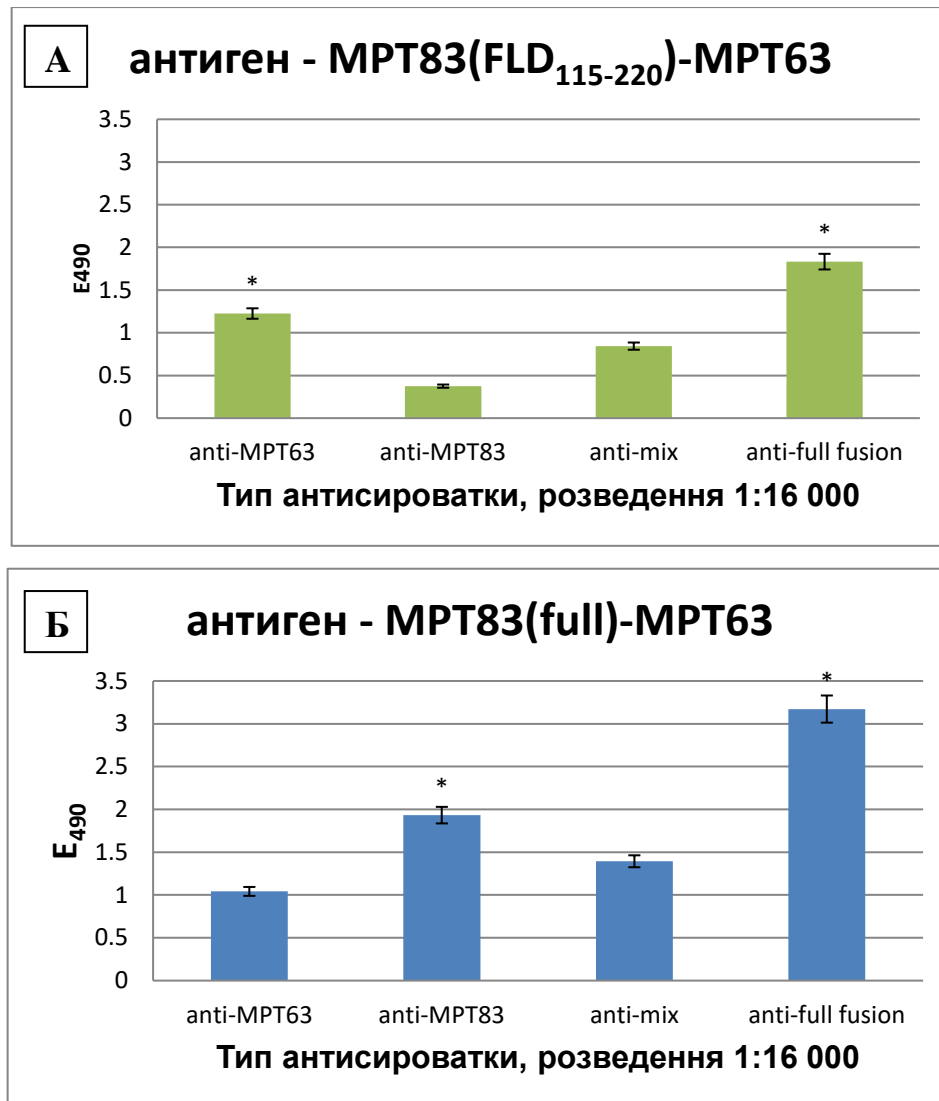


Рис. 6.6. Результати розпізнавання IgG злитих антигенів на основі фасциклінподібного домену MPT83(FLD 115-220)-MPT63 (А) та повнорозмірного аналогу MPT83-MPT63 (В) 4 типами антисироваток  
\* $P \leq 0,05$  у порівнянні з anti-mix

Таким чином, була доведена особлива роль MPT83 для імуногенності злитого антигену та важливе значення для просторової організації нової антигенної композиції (MPT83-MPT63) та пластичності експозиції її серологічно важливих епітопів.

АТ є важливим інструментом для вивчення біологічної активності мікобактеріальних антигенів та розробки тест-систем для кількісного

вимірювання антигенів у рідинах як біомаркерів патогенезу туберкульозу. Крім того, рекомбінантні АТ можуть бути використані для афінної очистки цих антигенів.

Тотальну РНК (2-5 мкг/мкл,  $A_{260}/A_{280} \geq 1,6$ ) із спленоцитів імунізованих мишей, які характеризувалися найвищою імунною відповіддю до антигенів МРТ63 та МРТ83, використовували як матрицю для реакції зворотної транскрипції для отримання кДНК з наступною ампліфікацією послідовності, що кодують варіабельні домени важких і легких ланцюгів імуноглобулінів.

Методом електрофорезу в агарозному гелі було ідентифіковано ПЛР-продукти масою 380 і 400 п.н., що відповідають розмірам відповідно до  $V_L$  та  $V_H$  (рис. 6.7, А). Очищені  $V_H$  та  $V_L$  були об'єднані за допомогою SOE-ПЛР, як описано в [119]. Гени, які кодують scFv та фагмідний вектор pCANTAB-5E, обробляли ендонуклеазними рестрикціями *SfiI* та *NotI* з наступним зшиванням T4 ДНК-лігазою.

Для виділення високоспецифічних scFv проти мікобактеріальних антигенів ми розробили модифіковану схему селекції, описану в [17]. Після селекції бібліотеки проти МРТ63 та МРТ83 кілька отриманих колоній тестували методом фільтр-аналізу (Lift Assay). У той же час більшість колоній були негативними (рис. 6.7, В).

Також декілька позитивних клонів були перевірені методом ІЕА. Щоб підтвердити, що ізольовані клони були високо специфічними для МРТ63 або МРТ83, ми проаналізували їх взаємодію з рядом контрольних антигенів. Було підтверджено, що відповідні антитіла scFv розпізнають МРТ63 або МРТ83 і не реагують перехресно між собою або з BSA та казеїном молока (рис.6.7, С).

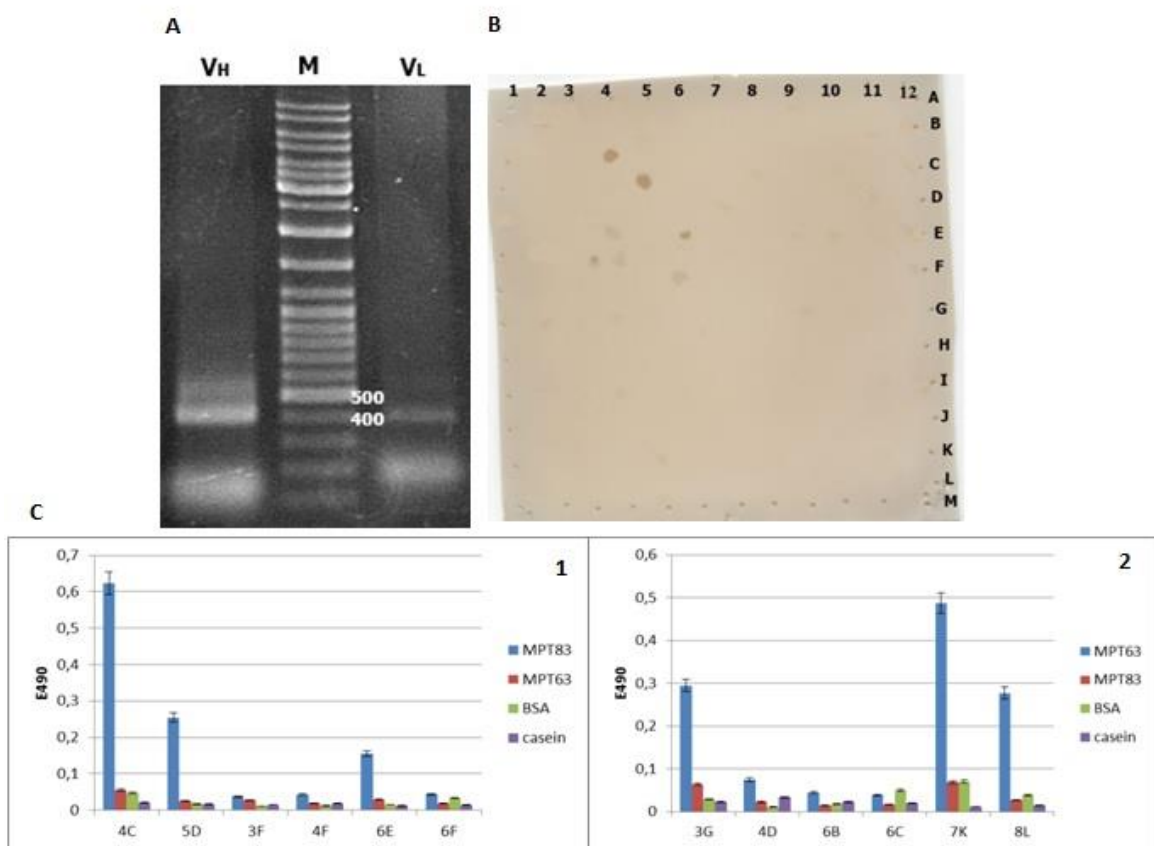


Рис. 6.7. Електрофореграма продуктів ПЛР ампліфікація V<sub>H</sub>- та V<sub>L</sub>-доменів (А). Результати експресії scFv до МРТ83 клітинами *E.coli* (Lift Assay) (В). Результати ІЕА периплазматичних екстрактів позитивних колоній *E.coli*, що містять scFv антитіла проти МРТ83 (1) та МРТ63 (2) (С).

Не дивлячись на те, що отримані антитіла не характеризувалися високою константою афінності, scFv-антитіла є аналогами моноклональних АТ. Такі молекули можуть бути використані як інструменти дослідження мікобактеріальних антигенів або навіть як компоненти тест-систем, наприклад, позитивний контроль.

### 6.3. Висновки до розділу

1. Було одержано та проаналізовано злитий протеїн на основі повнорозмірного МРТ83 та секреторного протеїну МРТ63.

2. Проведено порівняльну характеристику гуморальної відповіді тварин до введених імуногенів, на підставі якої було обрано злитий антиген МРТ83-МРТ63 для створення діагностичної тест-системи.
3. Методом фагового дисплею було відібрано МРТ83- та МРТ63-специфічні scFv антитіла, які можуть бути використані для дослідження біологічної ролі індивідуальних антигенів мікобактерій.

Результати, представлені у даному розділі, опубліковано у власних наукових працях [156, 158] та пройшли апробацію на:

1. 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.

2. 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.

## РОЗДІЛ 7 РОЗРОБКА ТА ВИПРОБУВАННЯ ІМУНОЕНЗИМНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ СПЕЦИФІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ВРХ ТА ЛЮДИНИ

### 7.1. Визначення чутливості та специфічності дослідного зразка тест-системи «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*» для діагностики туберкульозу легень у населення

Чутливість та специфічність, відтворюваність – головні показники та характеристики діагностичного тесту, які свідчать про надійність тест-системи, що оцінюється. Специфічність – це здатність тест-системи виявляти лише певну речовину, тобто визначати негативні зразки без хибнопозитивних результатів. Позитивний результат аналізу сироватки здорової людини може бути помилково інтерпретований лікарем як свідчення наявності у пацієнта інфекційного статусу і може призвести до призначення лікування від хвороби, на яку вона не страждає. Чутливість тест-системи як способу діагностики туберкульозу визначає ймовірність виявлення за допомогою неї цієї інфекції у хворих людей.

Чутливість та специфічність тест-системи розраховували за загальноприйнятими формулами для серологічних тестів на основі імуноензимного аналізу (ІЕА):

$$\text{Specificity (специфічність)} = (N / N + \text{ХП}) \times 100\%,$$

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

Згідно результатів ІЕА дослідної тест-системи на основі рекомбінантного химерного протеїну *M.tuberculosis* МРТ83-МРТ63 частка

істинно негативних результатів аналізу сироваток склала 95,5% (тест правильно класифікує їх як сироватки здорових людей). Частка хибнопозитивних результатів склала 4,5%, тобто таку кількість пацієнтів із вибірки тест помилково визначав як хворих.

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

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

Частка сироваток з істинно позитивним результатом аналізу (n=26) по відношенню до всіх сироваток пацієнтів хворих на туберкульоз (n=38) для дослідної тест-системи становила майже 70%.

Досягти показників 100% чутливості та специфічності в лабораторних умовах практично неможливо. Взаємозв'язок між чутливістю та специфічністю такий, що поліпшення одного показника супроводжується погіршенням іншого. Таким чином, не існує такого діагностичного тесту, який би гарантував абсолютну чутливість та специфічність при проведенні скринінгових досліджень населення.

У порівнянні з одержаними показниками чутливості та специфічності референсних тест-систем, що існують на ринку (тест-система 1, виробник Україна; тест-система 2, виробник Росія), запропонована нами тест-система характеризується не гіршими показниками інформативності серологічних тестів, а в деяких випадках і перевершує їх.

ІЕА нині є найпоширенішим методом діагностики завдяки ряду безперечних переваг. Однією з таких переваг є відтворюваність результатів, яка за умови достатньої специфічності та чутливості є запорукою отримання достовірних результатів. На відміну від серологічних діагностичних тестів на основі суміші антигенів або мікобактеріального лізату, запропонована нами тест-система гарантує відтворюваність отриманих результатів, оскільки використовує однорідну антигенну субстанцію на твердофазному носії (такій

характеристиці відповідає рекомбінантний злитий протеїн, що лежить в основі дослідної тест-системи).

Статистично показник відтворюваності визначали за середнім квадратичним відхиленням (SD, standard deviation). Потім цю величину використовували для обчислення граничного значення (ГЗ) та коефіцієнту варіації (CV).

Було визначено середнє значення та стандартне відхилення показників оптичної густини, отриманих в результаті аналізу сироваток здорових та хворих на туберкульоз людей за умов використання дослідної та референсних тест-систем. Показники дослідної тест-системи ( $0,11 \pm 0,05$ ,  $n=7$ ), референсної тест-системи 1 ( $0,085 \pm 0,041$ ) та референсної тест-системи 2 ( $0,078 \pm 0,02$ ) було порівняно між собою за коефіцієнтом варіації (рис. 7.1).

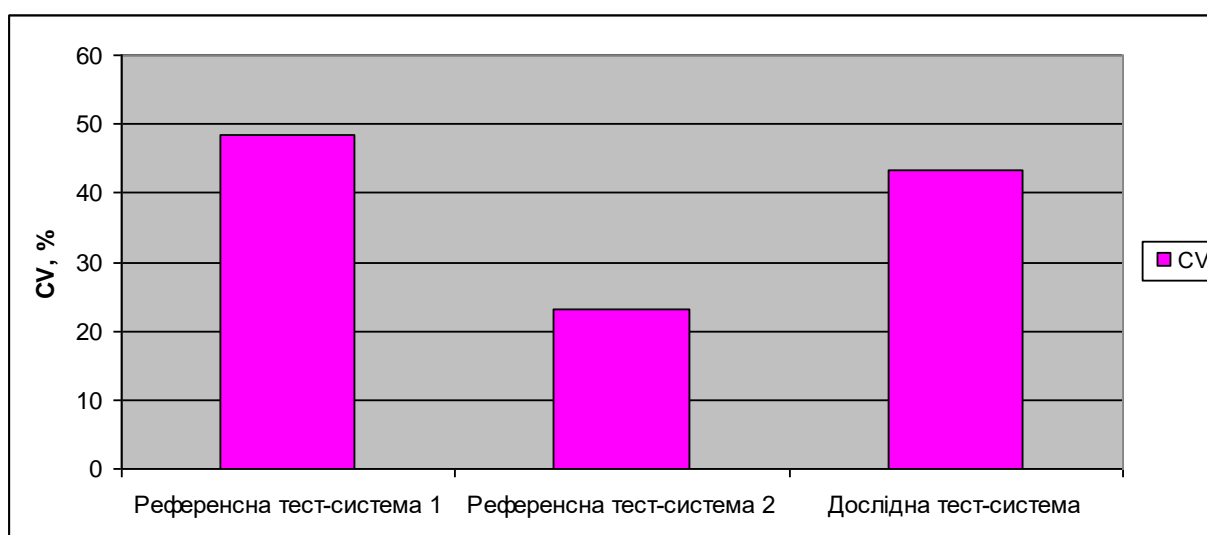


Рис. 7.1. Коефіцієнти варіації (CV) рівнів антитіл класу G у сироватках здорових людей, проведеного за допомогою дослідної тест-системи (43,3%), референсної тест-системи 1 (48,5%) та референсної тест-системи 2 (23,16%)

Вищі значення коефіцієнту варіації свідчать про більші коливання показника оптичної густини при аналізі досліджених зразків. Як ми бачимо, коефіцієнт варіації результатів аналізу сироваток здорових людей, проведеного за допомогою дослідної тест-системи, не перевищує значення відповідного показника референсної тест-системи 1.

## 7.2. Порівняння діагностичної ефективності розробленого дослідного зразка тест-системи та референтних тест-систем для діагностики туберкульозу легень

В референсних тест-системах найчастіше використовують як антигенну субстанцію висушений лізат мікобактерій, що не може забезпечити високу чутливість та специфічність аналізу. Цей недолік особливо дається взнаки при скринінгу населення імунізованого протитуберкульозною вакциною *BCG*. Тест-системи, що базуються на суміші окремих індивідуальних антигенів мікобактерій, характеризуються невисокою специфічністю та відтворюваністю аналізу. Ми намагалися звести нанівець подібні недоліки імунодіагностикумів, використовуючи як антиген для дослідної тест-системи високо імуногенний рекомбінантний злитий протеїн МРТ83-МРТ63.

Було проведено порівняльний аналіз дослідного зразка тест-системи та двох існуючих референтних імуноензимних тест-систем для діагностики туберкульозу.

Серед людей із визначеним щодо туберкульозу статусом, висока імунна відповідь спостерігалась у 69,5% (n=26) хворих пацієнтів при використанні дослідної тест-системи; у 45,16% (n=17) хворих пацієнтів при використанні референтної тест-системи 1 та аналогічна ситуація у хворих пацієнтів при використанні референтної тест-системи 2. Незважаючи на те, що всі три тест-системи мали псевдонегативні результати, дослідна тест-система з використанням у якості антигенної композиції рекомбінантного злитого протеїну *Mycobacterium tuberculosis* МРТ83-МРТ63 характеризувалась більшою чутливістю (рис. 7.2).

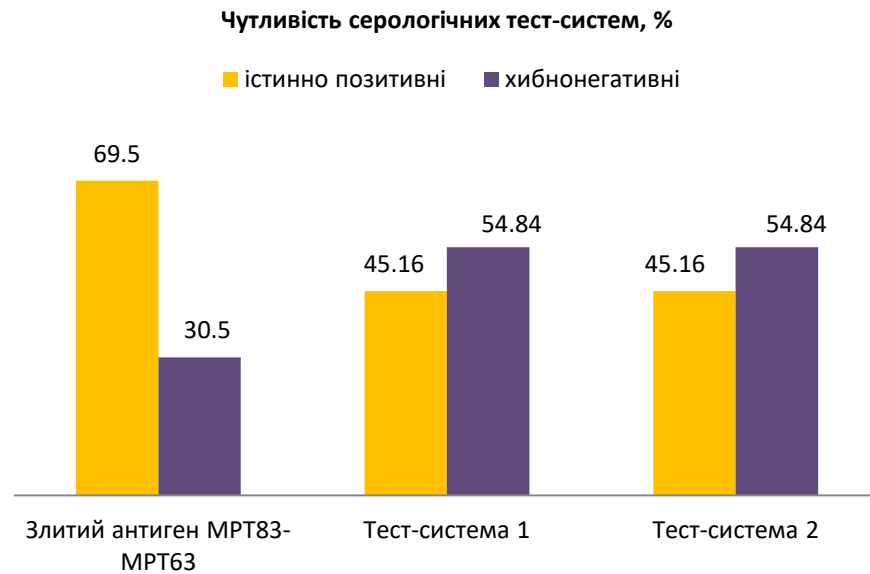


Рис. 7.2. Порівняльна характеристика чутливості дослідної тест-системи на основі рекомбінантного злитого білка MPT83-MPT63 та референсних тест-систем для діагностики туберкульозу

Також серологічні діагностикуми було перевірено на наявність хибнопозитивних результатів при аналізі сироваток 17 здорових донорів та 22 із не туберкульозними захворюваннями легень, що були відібрані для дослідження. При тестуванні референтної та дослідної тест-систем кількість хибнопозитивних результатів була мінімальною. Це означає, що запропонована нами тест-система характеризується специфічністю 95,5%, референсна тест-система 1 має специфічність 92,5%, а референсна тест-система 2 – 90,2% (рис. 7.3).

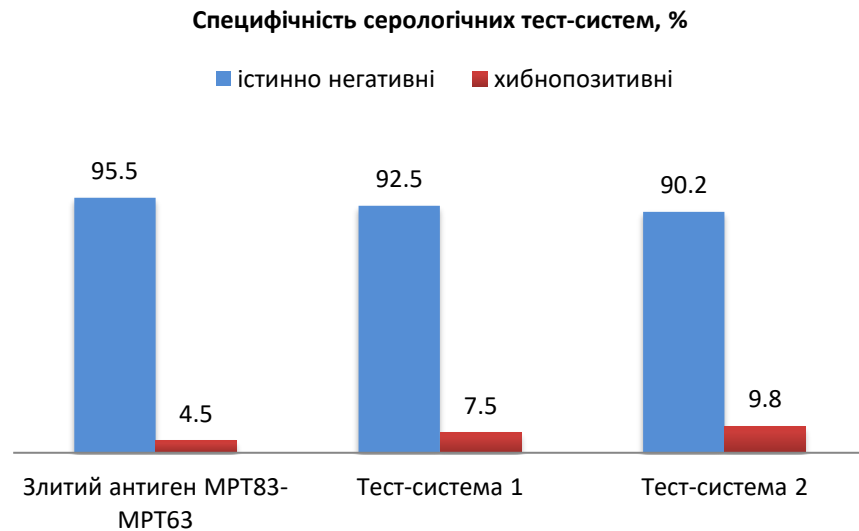


Рис. 7.3. Порівняльна характеристика специфічності дослідної тест-системи на основі рекомбінантного злитого білка МРТ83-МРТ63 та референсних тест-систем для діагностики туберкульозу

Таким чином дослідна тест-система характеризується найбільшою чутливістю серед трьох діагностикумів. Показник специфічності 95,5% є достатньо високим для застосування цієї тест-системи у клінічній практиці. Відтворюваність результатів аналізу також є достатньою для використання запропонованої тест-системи як допоміжного засобу для діагностики туберкульозу людини

### **7.3. Випробування експериментальної тест-системи «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*» для специфічної діагностики туберкульозу ВРХ**

За результатами проведених досліджень було встановлено, що тест-система «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*» виявилась ефективною для діагностики саме інфікованих *M.bovis* тварин. 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.

*M.fortuitum* та *M.intracellulare* – широко розповсюджені види *Mycobacterium* [110]. Ці штами викликають захворювання переважно у тварин чи пацієнтів, що характеризуються імунодефіцитними станами. Згідно філогенетичного аналізу, вищезгадані представники разом з *M.bovis* та *M.tuberculosis* характеризуються наявністю спільних антигенів, тому сенсibilізація атиповими мікобактеріями заважає діагностиці, заснованій на використанні гетерогенних сумішей антигенів, наприклад туберкуліну.

Антигенні складові химерного протеїну МРТ83(115-220)-МРТ63 ідентифіковані у представників *M.bovis/M.tuberculosis*, що забезпечило специфічність тест-системи для діагностики *Mycobacterium tuberculosis complex* у ВРХ. Окрім того, відсутність перехресних генних ділянок цих протеїнів у *M.bovis/M.tuberculosis* у порівнянні з іншими видами мікобактерій, виключає «хибнопозитивні» результати. Отже, дослідження наявності антитіл у тварин, заражених нетуберкульозними мікобактеріями (NTM) - невід'ємний етап дослідження антигенної композиції для визначення можливості її використання як компонента тест-системи для діагностики туберкульозу.

Крім зразків сироваток корів, заражених атиповими мікобактеріями, було проаналізовано сироватки корів, що негативно реагують на туберкулін та дають негативний результат в реакції імунодифузії (РІД); позитивно реагуючих на туберкулін для птиці (у яких діагноз туберкульозу не був підтверджений) та РІД-позитивних тварин (хворі на лейкоз). Згідно даних, одержаних в Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», ці зразки сироваток були охарактеризовані як негативні.

Реакції гіперчутливості сповільненого типу у корів на туберкулін для птахів підтверджує раціональність використання серологічних методів на основі ІФА для спростування хибно позитивних реакцій. Можливий контакт

тварин з птахами, зараженими *M. avium*, може відображатися на імунологічному статусі тварини, коли проявляється шкірна реакція як на туберкулін птиці, так і на туберкулін корів, але тварина при цьому не хворіє на туберкульоз. Хибнопозитивні результати шкіряної проби, які виникають внаслідок цього, негативно впливають на економічне становище фермерських господарств, що проявляється у забої здорової тварини та втраті вкладених у неї коштів.

Раніше було перевірено злитий протеїн МРВ83(115-220)-МРВ63 на реакцію щодо сироваток тварин, що були імунізовані вакцинним штамом *M. bovis BCG* (Патент України № 118447. 2017 лип. 10). Саме ця вакцина є причиною хибнопозитивних результатів при шкірній пробі у людей. Але при тестуванні злитого антигену зразки сироваток від даних тварин давали негативну відповідь, що лише доводить ефективність та доцільність використання серологічних методів з використанням окремих антигенів мікобактерій.

Серед тварин з визначеним щодо туберкульозу статусом висока відповідь на злитий протеїн МРВ83(115-220)-МРВ63 спостерігалася лише у тварини, інфікованих *M. bovis* ( $1,083 \pm 0,3407$ ,  $n=11$ ), та не була виявлена у тварин, інфікованих *M. intracellulare* ( $0,124 \pm 0,0077$ ,  $n=1$ ), *M. avium* ( $0,084 \pm 0,0058$ ,  $n=1$ ), *M. fortuitum* ( $0,124 \pm 0,0035$ ,  $n=1$ ), *M. kansasii* ( $0,123 \pm 0,0007$ ,  $n=1$ ), *M. paratuberculosis* ( $0,042 \pm 0,0005$ ,  $n=1$ ), та у тварин, негативно реагуючих на туберкулін і реакцію імунодифузії (РІД) ( $0,115 \pm 0,011$ ,  $n=23$ ), позитивно реагуючих на туберкулін для птиці ( $0,128 \pm 0,019$ ,  $n=10$ ) та РІД-позитивних тварин ( $0,119 \pm 0,03$ ,  $n=6$ ) (рис. 7.4).

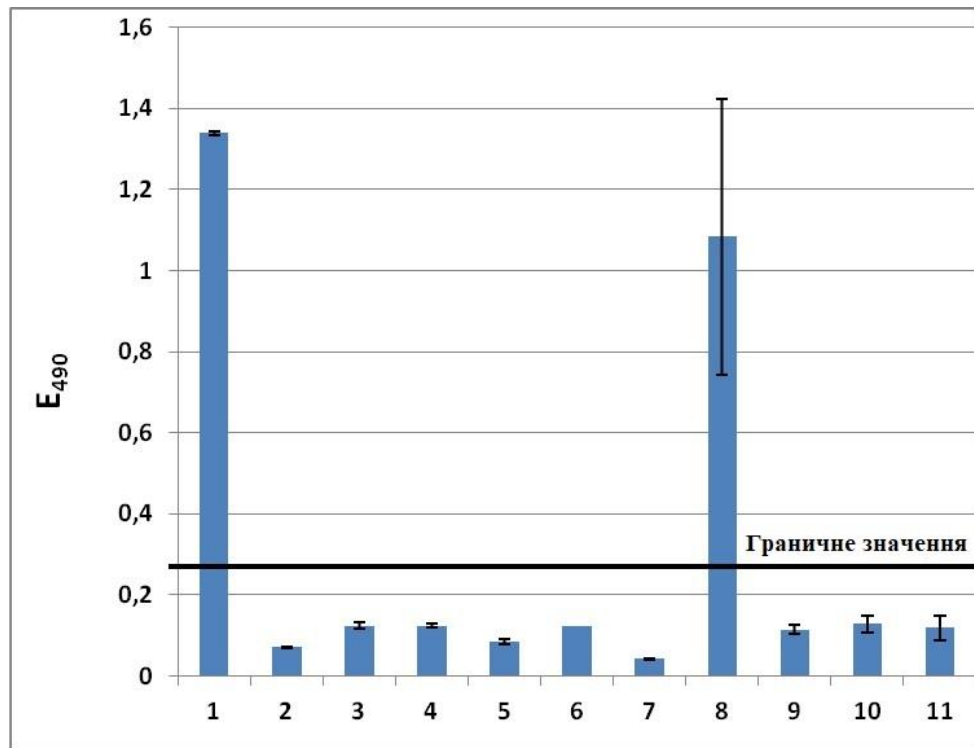


Рис. 7.4. Рівень IgG до цільового антигену MPT83(115-220)-MPT63 тест-системи «ІВ-Chem Anti-Mycobacterium bovis» у контролях та зразках сироваток корів з різними діагнозами захворювання: 1 – позитивний контроль, що містить імуноглобуліни ВРХ, специфічні до *M.bovis*; 2 – негативний контроль, що містить негативну сироватку крові ВРХ; 3 – *M.intracellulare*-інфіковані; 4 – *M.fortuitum*-інфіковані; 5 – *M.avium*-інфіковані; 6 – *M.kansasii*-іфніковані; 7 – *M.paratuberculosis*-інфіковані; 8 – *M.bovis*-інфіковані; 9 – негативно реагуючі на туберкулін і РІД; 10 – позитивно реагуючі на туберкулін для птиці (діагноз туберкульоз не підтверджений); 11 – РІД-позитивні тварини

Було розраховано граничне значення для даного аналізу тест-системи, який дорівнював 0,27. Рівень граничного значення розраховували, додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,2 (згідно інструкції виробника), тобто

Граничне значення = ОГ К- середнє + 0,2

Одержані результати свідчать про високу специфічність розробленої нами імуноферментної тест-системи «ІВ-Chem Anti-Mycobacterium bovis» з використанням злитого білка МРТ83(115-220)-МРТ63 для діагностики туберкульозу ВРХ.

За даними державної служби статистики України поголів'я ВРХ в Україні на січень 2016 року складає 3 млн. 750,3 тис. голів [151]. Проте, на першому етапі впровадження запропонованої моделі в практику ветеринарного моніторингу епізоотологічної ситуації з туберкульозу можна очікувати, що імуноферментний аналіз 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. Саме ця частина поголів'я може потребувати поглиблених лабораторних тестувань за допомогою імуноферментного аналізу

Крім того, «для відбору тварин на діагностичний забій або визначення причин алергічних реакцій можуть бути використані допоміжні методи діагностики», серед яких передбачено застосування імуноферментного аналізу (ІФА) (пункт 2.15 Наказу N 316 від 03.09.2009 «Інструкції з профілактики та боротьби з туберкульозом тварин», затвердженого Державним комітетом ветеринарної медицини України).

Отже, виявлення антитіл до збудника туберкульозу ВРХ *M. bovis* за допомогою серологічних методів діагностики, а саме, з використанням методу твердофазного ІФА, є важливим комплементарним способом контролю благополуччя стад щодо зараження на туберкульоз, оскільки:

1. Дозволяє своєчасно виявляти інфікованих *M. bovis* тварин у благополучних стадах, а також виявляти тварин із латентним перебігом цієї хвороби.

2. В неблагополучних щодо туберкульозу господарствах забезпечує виявлення анергічних до туберкуліну тварин, які є прихованими джерелами збудника цієї інфекції.

3. В період проведення оздоровчих заходів дозволяє успішно проводити контроль епізоотичної ситуації.

В перспективі пропонується удосконалення антигенної субстанції для підвищення показників специфічності та чутливості діагностики, а також створення швидких діагностичних тестів для профілактики туберкульозу.

#### 7.4. Висновки до розділу

1. Було розроблено дослідний зразок тест-системи для серологічної діагностики туберкульозу легень у населення.
2. Проведено порівняльну характеристику дослідної тест-системи з референтними діагностикумами, з якої випливає, що запропонована нами тест-система перевершує референтні щодо критеріїв надійності та відбору тест-систем.
3. Встановлено, що тест-система «IB-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*» виявилась ефективною для діагностики саме інфікованих *M.bovis* тварин.

Результати, представлені у даному розділі, опубліковано у власних наукових працях [155, 156] та пройшли апробацію на:

1. Сіромолот АА, Колибо ДВ. Одержання та тестування антигенної композиції протеїнів *Mycobacterium tuberculosis* МРТ63 та МРТ83 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.

2. 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.

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

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Туберкульоз — небезпечне інфекційне захворювання. Низька ефективність сучасних методів контролю над епідемічною ситуацією на туберкульоз пов'язана, перш за все, з недостатнім розумінням молекулярних механізмів патогенезу мікобактеріальної інфекції.

На сьогоднішній день є гостра необхідність у вдосконаленні засобів для діагностики туберкульозу. В 2015 р. було зафіксовано 10,4 млн нових випадків захворювання на ТБ у світі; смертність склала приблизно 1,3 млн серед ВІЛ-негативних та 0,374 млн серед ВІЛ-позитивних пацієнтів [10].

Окрім того, туберкульоз ВРХ є серйозною проблемою для сільського господарства як в Україні, так і у багатьох країнах світу. В той же час, інфекції, викликані *M.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 ТБ у людей, зокрема, у пацієнтів з різними імунодефіцитами [12,13]. Ситуацію ускладнює відсутність простого та доступного способу діагностування захворювання у ВРХ. Це значно утруднює моніторинг інфекційної ситуації та можливість своєчасного проведення заходів щодо попередження розповсюдження цієї інфекції.

Вивчення клітин- та молекул-мішеней окремих антигенів збудників інфекційних захворювань є важливим етапом для розуміння перебігу захворювання та створення засобів для їх профілактики та лікування. Відомо, що макрофаги — найбільш описана патогенетична мішень та клітина-господар для мікобактерій туберкульозу [5]. Логічно було припустити, що мішенню для антигенів *M.tuberculosis* МРТ63 та МРТ83 також є моноцито- та макрофагоподібні клітини. Показано, що в 3 незалежних експериментах в межах клітинної лінії U937 виокремлюється субпопуляція клітин, що зв'язуються з флуоресцентним похідним МРТ63. При морфологічному аналізі цієї субпопуляції показано, що за розміром ці клітини не відрізнялись

від загального пулу, але характеризувались збільшеною величиною бічного світлорозсіювання, визначеного за допомогою протокового цитофлуориметра, що прямо пропорційно гранулярності клітин. Так як не було зафіксовано специфічного зв'язування mCherry-MPT63 або FITC-MPT63 з макрофагоподібними клітинами лінії J774, перитонеальними макрофагами миші, було припущено, що мішенню дії MPT63 є макрофагоподібні клітини на певній стадії диференціювання, на користь чого свідчить зв'язування з невеликою субпопуляцією клітин U937. Так як секреторні антигени, як MPT63, можуть бути ідентифіковані всередині клітин-господарів, було перевірено наявність внутрішньоклітинних мішеней антигену серед зазначених клітинних ліній. Але специфічного зв'язування виявити не вдалось.

Ліпопротеїн MPT83, який є класичним лігандом TLR, зв'язувався з гетерогенною клітинною лінією U2149. Ця клітинна лінія була описана Genberg і співавторами [126], яка включає в себе клітини з фібробластоподібним та макрофагоподібним фенотипом, що було підтверджено з використанням антитіл до МНС II класу: при зафарбовуванні клітин виокремлювалась чисельна популяція, що зв'язувалась з АТ до МНС II. Взаємодію флуоресцентних похідних MPT83 з моноцитами, макрофагами, епітеліоцитами, лімфоцитами та фібробластиами виявити не вдалось.

Система вродженого (неспецифічного) імунітету є головною ланкою всієї мережі імунних реакцій, що відповідає за елімінацію та деактивацію численних патогенів [19]. Проте внутрішньоклітинне середовище макрофагів – клітин неспецифічного захисту – є основним місцем розмноження та виживання мікобактерій [5]. Зазвичай фагоцитоз бактерій макрофагами призводить до лізису патогенів та сприяє одужанню пацієнтів. Однак, мікобактерії туберкульозу виживають всередині фагоцитів шляхом запобігання дозрівання фагосом та злиття з пре-лізосомами [17].

Було показано, що довготривала інкубація перитонеальних макрофагів миші з антигенами *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83 підвищує відсоток клітин

з посиленою фагоцитарною активністю. Є два шляхи підвищення фагоцитарної ланки неспецифічного імунітету: або зростання числа клітин здатних до фагоцитозу серед популяції клітин, або зростання інтенсифікації фагоцитозу сталою кількістю клітин. В дослідженні було показано, що підвищення фагоцитарної активності після тригерної дії MPT63 та MPT83 відбувається за обома сценаріями. Окрім того, було показано, що антигени мікобактерій MPT63 та MPT83 не сприяють підвищенню фагоцитарної активності клітин лінії J774. Цей факт можна пояснити тим, що малігнізовані клітини перебувають у стані постійної дії активаційних факторів [152] і такого зростання або не було, або неможливо було зафіксувати існуючими методами. Варто зауважити, так як мішенями мікобактеріальних антигенів були лише певні субпопуляції в межах клітинних ліній, можна припустити що ефект міг бути саме на такій субпопуляції, що краще представлено на первинній культурі клітин, ніж на гомогенній малігнізованій клітинній лінії.

Було запропоновано гіпотезу, що молекули-мішені для протеїнів *M.tuberculosis* MPT63 та MPT83 можуть бути у клітинах з макрофагальним фенотипом. Ці імунодомінантні мікобактеріальні протеїни полегшують фагоцитоз бактерій макрофагами для їх виживання та розмноження всередині фагоцитів. Це може бути одним з шляхом, за яким бактерії можуть втекти з позаклітинного середовища в організмі, що містить багато факторів вродженого та адаптивного імунітету, які здатні до елімінації патогену. І як результат фагоцитозу мікобактерії здатні рости і розмножуватися в середині макрофагів. Таким чином, одна з функцій MPT63 і MPT83 може полягати у "специфічному" захисті збудника від імунних реакцій господаря.

Рекомбінантні антигени можуть сприяти дозріванню макрофагів, що було показано методами імуноцитохімії при вивченні експресії маркерів активації цих клітин – CD11b та F4/80. CD11b ( $\beta$ -ланцюг Mac-1, також відомого як рецептор комплекменту CR3) – це інтегрин, що у великих кількостях представлений на активованих макрофагах та дендритних клітинах, і безпосередньо задіяний у індукції клітинної імунної відповіді,

зокрема процесах фагоцитозу, цитотоксичності та міграції [138-140]. Більше того відомо, що CR3 відіграє важливу роль у процесі захоплення мікобактерій макрофагами як за антитіло-залежним, так і за антитіло-незалежним механізмом [141]. Після стимуляції макрофагів MPT63 кількість клітин, що активно реагували з FITC міченими АТ до CD11b зростала на 50%, а після дії MPT83 – майже на 30% у порівнянні з контролем.

Ми перевірили чи призводить стимуляція MPT63 та MPT83 до зростання відсотку кількості клітин з високою експресією F4/80 – маркеру зрілих макрофагів. І переконалися, що справді таке зростання має місце. Після стимуляції MPT63 кількість клітин, що активно реагували з FITC міченими АТ до F4/80, зростала на 17%, а після тригерної дії MPT83 – на 15%.

Цікавим виявилось і те, що такі зміни відбувались після 24 год інкубації з мікобактеріальними протеїнами, але якщо час інкубації зменшувався до 30 хв або до 8 год ефект не спостерігався. Зміни в експресії CD11b на поверхні можуть відбуватись вже через декілька хвилин після стимуляції [142] за рахунок його внутрішньоклітинного пулу. Оскільки після стимуляції MPT63 та MPT83 для зміни рівня представленості CD11b необхідний час, вірогідно цей процес обумовлений змінами в експресії гена CD11b. Хоча після інкубації з MPT63 та MPT83 рівень клітин з високою експресією CD11b був вищим, ніж для F4/80 після інкубації з тими ж антигенами, загалом, вірогідно, в обох випадках підвищення експресії CD11b та F4/80 є наслідком активації макрофагів, зумовленої стимуляцією MPT63 та MPT83.

Тобто, при стимуляції MPT63 та MPT83 відбувається активація макрофагів. У випадку MPT83 такий ефект є цілком передбачуваним і може бути пояснений стимуляцією через взаємодію з TLR2. Натомість, з отриманих результатів випливає, що MPT63 так само здатен викликати активацію макрофагів, а, отже, повинен існувати певний специфічний механізм впливу MPT63 на макрофагальні клітини.

Одержані результати щодо впливу досліджуваних мікобактеріальних антигенів на желатиназну активність ММП свідчать про потенційну роль цих антигенів у розвитку та формуванні гранулом, які є осередками розмноження мікобактерій. Більш того, відомо що після інтраназального зараження мишей мікобактеріями активність матриксних металопротеїназ зростає вже на 9 добу [146].

Крім того, було показано проапоптичні властивості рекомбінантних антигенів МРТ63 та МРТ83 на клітинах лінії J774, що не спостерігались для клітин, що репрезентують фенотип фібробластів, епітелія та моноцитів. І якщо для МРТ83 такий ефект був нещодавно показаний на інфікованих макрофагах через TLR2/p38/COX-2 сигнальний шлях [69], то для МРТ63, ймовірно, за рахунок транслокації p65 субодиниці НК-кВ з ядра до цитозолу, і, як наслідок, інгібування транскрипції прозапальних цитокінів, та індукції апоптозу.

У цьому дослідженні були зроблені спроби оцінити імунодіагностичний потенціал секреторного протеїну МРТ63 та асоційованого з клітинною стінкою ліпопротеїну МРТ83 *M. tuberculosis* для розробки нового методу серодіагностичного тесту на основі ІЕА з використанням індивідуальних, злитих або коктейлю рекомбінантних антигенів для підвищення чутливості імунологічного аналізу, а також спроби перевірити специфіку всіх варіантів антигенних речовин.

Одержані результати чітко демонструють, що для нового діагностичного туберкульозу на основі ІЕА злитий протеїн МРТ83-МРТ63 був найкращим кандидатом серед випробуваних антигенів на роль сорбуючого агента на твердофазному носії. Цей химерний антиген як суміш окремих МРТ63 і МРТ83 характеризується більш високими імуногенними та антигенними властивостями, ніж індивідуальна імунна відповідь до протеїнів *M.tuberculosis* МРТ63 або МРТ83. Але на відміну від серологічної діагностики на основі суміші антигенів або мікобактеріальних лізатів наш пропонований злитий антиген МРТ83-МРТ63 гарантує відтворюваність

результатів, через однорідність сорбції. Недоліком використання суміші або лізатів є те, що для антигенної суміші кожен антиген повинен бути протестований окремо, що призводить до збільшення вартості аналізу, термінів його реалізації та не дуже адекватної оцінки результатів.

Слід зазначити, що завдяки високому рівню антигенності та імуногенності злитого антигену МРТ83-МРТ63, він може виявити слідові кількості антитіл до патогену. Також використання двох абсолютно негомологічних білків МРТ63 та МРТ83 з різними ефектами та досі відомими функціями збільшує його значення для ідентифікації біомаркерів туберкульозної інфекції. Відсутність генів *mpt63* і *mpt83* у штамів атипівих мікобактерій дозволяє використовувати цей антиген для діагностики як *M.tuberculosis* так і *M.bovis* (штамів, що викликають туберкульоз легень) у інфікованих пацієнтів [46].

Таким чином, на підставі результатів розпізнавання різних антигенів та їх коктейлів, було обрано химерний антиген МРТ83-МРТ63 для діагностики ТБ та скринінгу пацієнтів за допомогою ІЕА для подальшої розробки прототипу нового діагностичного набору.

Одержаний рекомбінантний антиген МРТ83-МРТ63 та його аналог на основі фасциклінподібного домену МРТ83(FLD 115-220)-МРТ63 були протестовані на сироватках хворих на ТБ легень ВРХ, інфікованих атипівими мікобактеріями корів, лейкозних та умовно-здорових тварин та пацієнтів, хворих на ТБ, а також на сироватках пацієнтів із не туберкульозними захворюваннями легень.

Серед сучасних методів виявлення туберкульозу як у ВРХ, так і у людини найбільш широко використовуються визначення реакції гіперчутливості сповільненого типу (наприклад, шкірний тест на туберкулін) до РРД та *in vitro* аналіз для вимірювання гамма-інтерферону (IFN- $\gamma$ ) у відповідь на стимуляцію мікобактеріальними антигенами [153]. Однак, ці методи або недостатньо специфічні, або досить дорогі, або потребують багато часу для встановлення діагнозу. Завдяки досить потужній

вірулентності патогенних мікобактерій, рання діагностика є необхідною для запобігання поширенню захворювання серед стада чи населення. Серодіагностика за допомогою ІЕА широко використовувалася для визначення різних інфекційних захворювань, в тому числі ТБ.

Було показано, що використання злитого протеїну підвищує показники специфічності та чутливості тест-систем у порівнянні з існуючими на ринку діагностикумами. Так чутливість експериментальної тест-системи з використанням МРТ83-МРТ63 для діагностики туберкульозу людини склала 70% у порівнянні з 45% у двох різних тест-системах. За показниками специфічності експериментальна та референтні тест-системи практично не

Не менш обнадійливими виявились результати тестування неповнорозмірного аналогу МРТ83-МРТ63 на основі МРТ83(FLD 115-220) для діагностики туберкульозу у ВРХ. Прояв реакції гіперчутливості сповільненого типу у корів на туберкулін для птахів підтверджує раціональність використання серологічних методів на основі ІЕА для спростування хибнопозитивних реакцій. Так як птахи є носіями атипової мікобактерії *M. avium*, контакт ВРХ з ними може бути наслідком встановлення встановлення помилкового імунного статусу імунодіагностичними тестами. Наявність хибнопозитивних результатів туберкулінової шкірної проби, які виникають внаслідок цього явища, негативно впливають на економічне становище країн, де розвинутий агропромисловий сектор.

Раніше було перевірено злитий протеїн МРВ83(115-220)-МРВ63 на реакцію щодо сироваток тварин, що були імунізовані вакцинним штамом *M. bovis BCG*. Саме ця вакцина є причиною хибнопозитивних результатів при шкірній пробі у людей. Але при тестуванні злитого антигену зразки сироваток від даних тварин давали негативну відповідь, що лише доводить ефективність та доцільність використання серологічних методів з використанням окремих скрупульозно підібраних антигенів мікобактерій.

За даними державної служби статистики України поголів'я ВРХ в Україні на січень 2016 року складає 3 млн. 750,3 тис. голів. Проте, на першому етапі впровадження запропонованої тест-системи в практику ветеринарного моніторингу епізоотологічної ситуації з ТБ 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 атипovими мікобактеріями, існує необхідність диференціації алергічних та параалергічних реакцій на туберкулін. Саме ця частина поголів'я може потребувати поглиблених лабораторних тестувань за допомогою ІЕА.

За результатами роботи було створено 2-ві промислові діагностичні тест-системи для діагностики захворювання у ВРХ «ІВ-Chem Anti-Mycobacterium bovis» та у людей «ІВ-Chem Anti-Mycobacterium tuberculosis». Корисні моделі захищені патентами України.

Класична вакцина BCG використовується у всьому світі для запобігання захворюванню на ТБ у немовлят та дітей, проте вона продемонструвала обмежену та нестабільну ефективність для профілактики ТБ легень у підлітків та дорослих. Вивчення імунізації у мишей показало, що MPT83-MPT83 є високо імуногенним протеїном у комплексі з ад'ювантом. Хоча не було досліджено протективну ефективність вакцинації мишей до *M. tuberculosis* у порівнянні з традиційною вакцинацією BCG, альтернативні антигени та додаткові підходи для розробки вакцини можуть знадобитися для формування захисту від цього захворювання. Тим не менше, ці результати створюють нову платформу для розвитку антигенних речовин із властивими їм імуногенними характеристиками, які є важливими для створення вакцин. Оскільки мікобактеріальні антигени MPT63 та MPT83 є імунодомінантними у штамів *M.bovis* або *M.tuberculosis*, розробка вакцин на їх основі є перспективним напрямом у біотехнології та профілактиці туберкульозу.

## ВИСНОВКИ

Виявлена в дисертаційній роботі здатність рекомбінантних протеїнів *M.tuberculosis complex* MPT63 та MPT83 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 МРТ63 в ядрах клітин J774 знижуються рівні p65 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Фещенко ЮІ, Мельник ВМ, Турченко ЛВ. Концепція реформування протитуберкульозної служби та оптимізації протитуберкульозних заходів в Україні (проект). Укр. пульмонол. журн. 2015;(1):15-9.
2. . Фещенко ЮІ, Мельник ВМ, Зайков СВ, Веселовський ЛВ, Линник МІ. Особливості сучасної ситуації з туберкульозу в Україні. Укр. пульмонол. журн. 2016;(1):5-9.
3. Нізов НМ, Кузін ІВ, Щербінська АМ, Стельмах ОМ, Сорока ІЗ, Марциновська МА, та ін. Туберкульоз в Україні (Аналітично-статистичний довідник). Київ: Український центр контролю за соціально небезпечними хворобами МОЗ України, Центр медичної статистики МОЗ України; 2016. 235 с.
4. Туберкулез. Информационный бюллетень ВОЗ. 2016. Доступно на: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/ru/>
5. Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. Eur Respir J. 2005;26(2):339-50.
6. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature.1998;393(6685):537-44.
7. Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, et al. Whole-genome comparison of Mycobacterium tuberculosis clinical and laboratory strains. J. Bacteriol. 2002;184(19):5479-90.
8. Shafi J, Andrew PW, Barer MR. Microarrays for public health: genomic epidemiology of tuberculosis. Comp. Funct. Genomics. 2002;3(4):362-5.
9. Matsegora NA, Golubenko MYu, Lekan OYa, Omelian LP. Changes in haemogram of pulmonary TB patients during positive clinical and radiology improvement. Journal of Education, Health and Sport. 2017;7(1):317-22.

10. World Health Organization. Global tuberculosis report 2017.[Internet]. Available from: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) (accessed, February, 2018).
11. Roug A., Perez A., Mazet J.A., Clifford DL, VanWormer E, Paul G, et al. Comparison of intervention methods for reducing human exposure to *Mycobacterium bovis* through milk in pastoralist households of Tanzania. *Prev Vet Med.* 2014;115(3-4):157-65.
12. Ameni G, Tadesse K, Hailu E, Deresse Y, Medhin G, Aseffa A, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* between farmers and cattle in central Ethiopia. *PLoS One*. 2013;8(10):768-91.
13. Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev.sci.tech.off. int.Epiz.* 2001;20(1):71-85.
14. Liu L, Zhu HR, Yang GJ. Current situation of endemic status, prevention and control of neglected zoonotic diseases in China. *Review Chinese.* 2013;25(3):307-11.
15. Hrabec E, Zi M. Circulation level of matrix metalloproteinase-9 is correlated with disease severity in tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;(6):713-9.
16. Marino S, El-Kebir M, Kirschner DA. Hybrid multi-compartment model of granuloma formation and T cell priming in tuberculosis. *J Theor Biol.* 2011;280(1):50-62.
17. Rook GA, Hamelmann E, Brunet LR. *Mycobacteria* and allergies. *Immunobiology.* 2007;212(6):461-73.
18. Rhodes SG, McKinna LC, Steinbach S, Dean GS, Villarion-Ramos B, Whelan AO, et al. Use of antigen-specific interleukin-2 to differentiate between cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and cattle infected with *M. bovis*. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(1):39-45.
19. Janeway CA. *Imunobiology.* 5th ed. New York: Garland Publishing; 2001. 882 p.

20. Marino S, Kirschner DE. The human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in lung and lymph node. *J Theor Biol.* 2004;227(4):463-86.
21. González-Juarrero M, O'Sullivan MP. Optimization of inhaled therapies for tuberculosis: the role of macrophages and dendritic cells. *Tuberculosis.* 2011;91(1):86-92. doi:10.1016/j.tube.2010.08.007.
22. Dallenga T, Repnik U, Corleis B, Eich J, Reimer R, Griffiths GW, et al. Tuberculosis-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. *Cell Host Microbe.* 2017;22(4):519-30.
23. Palomino JC, Leao SC, Rittaco V. Tuberculosis: from basic science to patient care. San Paulo. Brazil publishing; 2007. 686 p.
24. Lerner TR, Borel S, Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol.* 2015;17(9):1277–85. doi: 10.1111/cmi.12480
25. Marino S, Pawar S, Fuller CL, Reinhart TA, Flynn JL, Kirschner DE. Dendritic cell trafficking and antigen presentation in the human immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2004;173(1):494-506.
26. Shekhar S, Yang X. Natural killer cells in host defense against veterinary pathogens. *Immunol Immunopathol.* 2015;168(1-2):30-44.
27. Venkatasubramanian S., Cheekatla S., Paidipally P, Tripathy D, Welch E, Tvinnereim A, et al. IL-21-dependent expansion of memory-like NK cells enhances protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* 2017;10(4):1031-42.
28. Cheekatla S.S., Tripathi D., Venkatasubramanian S, Nathella P, Paidipally P, Ishibashi M, et al. NK-CD11c+ Cell crosstalk in diabetes enhances IL-6-mediated inflammation during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS Pathog.* 2016;12(10):1-12
29. Julia M, Scordo Daren L, Knoell Jordi B. Alveolar epithelial cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection: Active Players or Innocent Bystanders. *J Innate Immun.* 2016;8(1):3–14. doi:10.1159/000439275

30. Gupta N, Kumar R, Agrawal B. New players in immunity to tuberculosis: the host microbiome, lung epithelium, and innate immune cells. *Front Immunol.* 2018;9(7091):1-10 doi: 10.3389/fimmu.2018.00709
31. Castro-Garza J, King CH, Swords WE, Quinn FD. Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell monolayers. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;212:145-9.
32. Reuschl AK, Edwards MR, Parker R, Connel DW, Hoang L, Halliday A, et al. Innate activation of human primary epithelial cells broadens the host response to *Mycobacterium tuberculosis* in the airways. *PLOS Pathogens* 2017;1-26. doi.org/10.1371/journal.ppat.1006577
33. Kviatcovsky D, Rivadeneyra L, Balboa L, Yokobori N, Lopez B, Ritacco V, et al. *Mycobacterium tuberculosis* multidrug-resistant strain M induces low IL-8 and inhibits TNF- $\alpha$  secretion by bronchial epithelial cells altering neutrophil effector functions. *Hindawi. Mediators of Inflammation.* 2017;(2810606):1-13.
34. Reddy VM ,Hayworth DA. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with human respiratory epithelial cells (HEp-2). *Tuberculosis.* 2002;82(1):31-6.
35. Saiga H, Nishimura J, Kuwata H, Okuyama M, Matsumoto S, Sato S. Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J Immunol.* 2008;181(12):8521-7.
36. Deporter DA. The possible role of the fibroblast in granuloma-induced bone resorption in the rat. *J Pathol.* 1979;127(2):61-4.
37. González-Avila G, Sandoval C, Herrera MT, Ruiz V, Sommer B, Sada E, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Effects on Fibroblast Collagen Metabolism. *Respiration.* 2009;77(2):195–202. doi:10.1159/000163064
38. Saita N, Ando M, Araki S, Yoshinaga M. Fibroblast proliferation factors in pulmonary granuloma induced by *Trichosporon cutaneum* in rabbits: presence of a lymphocyte-derived fibroblast proliferation factor and its functional specificity. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;95(4):294-302.
39. O'Kane CM, Elkington PT, Friedland JS. Monocyte-dependent oncostatin M and TNF- $\alpha$  synergize to stimulate unopposed matrix metalloproteinase-1/3

- secretion from human lung fibroblasts in tuberculosis. *Eur J Immunol.* 2008;38(5):1321-30. doi: 10.1002/eji.200737855
40. Schragar LK, Izzo A, Velmurugan K. Immunopathogenesis of tuberculosis and novel mechanisms of vaccine activity. *Tuberculosis.* 2016;99(1):3-7.
  41. Nagai S, Wiker HG, Harboe M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1991;59(1):372-82.
  42. Sørensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995;63(5):1710-7.
  43. Sinha P, Gupta A, Prakash P, Anupurba S, Tripatny R, Srivastava GN. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32kD alpha antigen encoding gene fragments. *BMC Infect Dis.* 2016;16(123):12-21. doi: 10.1186/s12879-016-1450-1
  44. Manca C, Lyashchenko K, Wiker HG. Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1997;65(1):16-23.
  45. Yu DH, Hu XD, Cai H. Efficient tuberculosis treatment in mice using chemotherapy and immunotherapy with the combined DNA vaccine encoding Ag85B, MPT-64 and MPT-83. *Gene therapy.* 2008;15(9):652-9.
  46. Kobayashi K, Kamiie K, Kobayashi A. Nucleotide sequence of MPB63 gene in *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo. *J Basic Microbiol.* 2003;43(3):249-54.
  47. Mukherjee M, Ghosh R, Chattopadhyay K, Ghosh S. pH-induced structural change of a multi-tryptophan protein MPT63 with immunoglobulin-like fold: identification of perturbed tryptophan residue/residues. *Biomol Struct Dyn.* 2015;33(10):2145-60.
  48. Horwitz MA, Harth G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 2003;71(4):1672-9.

49. Guolding CW, Parseghian A, Sawaya MR, Cascio D, Apostol MI, Gennaro ML. Crystal structure of a major secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis* – MPT63 at 1.5Å resolution. *Protein Sci.* 2002;11(2):2887-93.
50. Muñoz S, Hernández-Pando R, Abraham S. Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J Immunol.* 2003;170(11):5590-6.
51. Chambers MA, Whelan AO, Spallek R, Singh M, Coddeville B, Guerardel Y, et al. Non-acylated *Mycobacterium bovis* glycoprotein MPB83 binds to TLR1/2 and stimulates production of matrix metalloproteinase 9. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;400(3):403-8.
52. Marino S, Kirschner DE. The human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in lung and lymph node. *J Theor Biol.* 2004;227(4):463-86.
53. Chen ST, Li JY, Zhang Y, Gao X, Mai H. Recombinant MPT83 derived from *Mycobacterium tuberculosis* induces cytokine production and upregulates the function of mouse macrophages through TLR2. *J Immunol.* 2012;188(2):668–77.
54. Skerry C, Klinkenberg LG., Page KR, Karacousis PC. TLR2-modulating lipoproteins of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex enhance the HIV infectivity of CD4+ T cells. *PLoS One.* 2016;11(1):12-23.
55. Udgata A, Qureshi R, Mukhopadhyay SJ. Transduction of functionally contrasting signals by two *Mycobacterial* PPE proteins downstream of TLR2 receptors. *Immunol.* 2016;197(5):1776-87.
56. Fonte E, Agathangelidis A, Reverberi D, Ntoufa S, Scarfo L, Ranchetti P, et al. Toll-like receptor stimulation in splenic marginal zone lymphoma can modulate cell signaling, activation and proliferation. *Haematologica.* 2015;100(11):1460-8.
57. Lawrence T. The nuclear factor NF-κB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):1-10.
58. Tak PP, Firestein GS. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *Clin Invest.* 2001;107(1):7–11. doi: 10.1172/JCI11830

59. Marino S, El-Kebir M, Kirschner DA. Hybrid multi-compartment model of granuloma formation and T cell priming in tuberculosis. *J Theor Biol.* 2011;280(1):50-62.
60. Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF- $\kappa$ B signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2625–32. doi: 10.1172/JCI26322
61. Peters RT, Maniatis T. A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1471(2):57-62.
62. Chambers M. A., Whelan A.O., Spallek R, Singh M, Coddeville B, Guerardel Y, et al. Non-acylated *Mycobacterium bovis* glycoprotein MPB83 binds to TLR1/2 and stimulates production of matrix metalloproteinase 9. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;400(3):403-8.
63. Marino S, Kirschner DE. The human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in lung and lymph node /. // *Journal of theoretical biology.* 2004;227(4):463–86.
64. Wiker HG. MPB70 and MPB83-major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scand J Immunol.* 2009;69(6):492-9.
65. Juárez MD, Torres A, Espitia C. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the mpt83 and mpt70 genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;203(1):95-102.
66. Harboe M, Whelan AO., Ulvund G, McNair J, Pollock JM, Hewinson RG, et al. Generation of antibodies to the signal peptide of the MPT83 lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* 2002;55(1):82-7.
67. Said-Salim B, Mostowy S, Kristof AS. Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Rv0444c, the gene encoding anti-SigK, explain high level expression of MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis*. *Mol Microbiol.* 2006;62(5):1251-63.
68. Becker K, Haldimann K, Selchow P, Reinau LM, Dal Molin M, Sander P. Lipoprotein glycosylation by protein-O-mannosyltransferase (MAB\_1122c) contributes to low cell envelope permeability and antibiotic resistance of

- Mycobacterium abscessus*. Front Microbiol. 2017;8:1-12. doi: 10.3389/fmicb.2017.02123
69. Wang L, Zuo M, Chen H, Liu S, Wu X, Cui Z, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein MPT83 induces apoptosis of infected macrophages by activating the TLR2/p38/COX-2 signaling pathway. J Immunol. 2017;198(12):4772-80. doi: 10.4049/jimmunol.1700030
70. Palomino JC, Leao SC, Rittaco V. Tuberculosis: from basic science to patient care. San Paulo. Brazil publishing; 2007. 686 p.
71. Cole ST, Barrell BG. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Novartis Found Symp. 1998;217:60-72.
72. Sharma D, Bisht D. *M. tuberculosis* hypothetical proteins and proteins of unknown function: hope for exploring novel resistance mechanisms as well as future target of drug resistance. Front Microbiol. 2017;8:465-76. doi: 10.3389/fmicb.2017.00465
73. Sousa EM, Costa AC, Trentini MM, Araújo Filho JA, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Immunogenicity of a fusion protein containing immunodominant epitopes of Ag85C, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis* in mice and active TB infection. PLoS One. 2012;7(10):477-81. doi: 10.1371/journal.pone.0047781
74. Dautin N, de Sousa-d'Auria C, Constantinesco-Becker F, Labarre C, Oberto J, Li de la Sierra-Gallay I, et al. Mycoloyltransferases: A large and major family of enzymes shaping the cell envelope of Corynebacteriales. Biochim Biophys Acta. 2017;1861:3581-92. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.06.020
75. Liu Y, Zhou S, Deng Q. Identification of a novel inhibitor of isocitrate lyase as a potent antitubercular agent against both active and non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. 2016;97:38-46. doi: 10.1016/j.tube.2015.12.003
76. Leao SC, Rocha CL, Murillo LA, Parra CA, Patarroyo ME. A species-specific nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a protein

- that exhibits hemolytic activity when expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1997;179(9):3053–7.
77. Nakata N, Matsuoka M, Kashiwabara Y. Nucleotide sequence of the *Mycobacterium leprae* katG region. *Infect Immun.* 1995;63(11):4301–6.
78. Zhou ZQ, Wang ZK, Zhang L, Ren YQ, Ma ZW, Zhao N, et al. Role of ESAT-6 in renal injury by regulating microRNA-155 expression via TLR4/MyD88 signaling pathway in mice with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Biosci Rep.* 2017;37(4):1-21. doi: 10.1042/BSR20170021
79. Tsai KN, Chan EC, Tsai TY, Chen KT, Chen CY, Hung K, et al. Cytotoxic effect of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10/ESAT-6 protein on the crucial pathways of WI-38 cells. *J Biomed Biotechnol.* 2009;917084:1-10. doi:10.1155/2009/917084
80. McShane H, Jacobs WR, Fine PE, Reed SG, McMurray DN, Behr M, et al. BCG: myths, realities, and the need for alternative vaccine strategies. *Tuberculosis.* 2012;92(3):283-8.
81. Derrick SC, Yang AL, Morris SL. A polyvalent DNA vaccine expressing an ESAT6-Ag85B fusion protein protects mice against a primary infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts BCG-induced protective immunity. *Vaccine.* 2004;23(6):780-8.
82. Miller J, Williamson ED, Lakey JH, Pearce MJ, Jones SM, Titball RW. Titball a Macromolecular organisation of recombinant *Yersinia pestis* F1 antigen and the effect of structure on immunogenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998;2(3):213-21.
83. Berrêdo-Pinho M, Kalume DE, Correa PR, Gomes LH, Pereira MP, Silva RF, et al. Proteomic profile of culture filtrate from the Brazilian vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Moreau compared to *M. bovis* BCG Pasteur. *BMC Microbiol.* 2011;11(80):1-9.
84. Kim H.J., Prithiviraj K., Groathouse N, Brennan PG, Spencer JS. Gene expression profile and immunological evaluation of unique hypothetical

- unknown proteins of *Mycobacterium leprae* by using quantitative real-time PCR. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(2): 181-90. doi: 10.1128/CVI.00419-12
85. Karbalaei Zadeh Babaki M, Soleimanpour S, Rezaee SA, et al. Antigen 85 complex as a powerful *Mycobacterium tuberculosis* immunogene: Biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. *Microb Pathog.* 2017;112:20-9. doi:10.1016/j.micpath.2017.08.040
86. Purohit MR, Sviland L, Wiker H, Mustafa T. Rapid and specific diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by immunostaining of tissues and aspirates with anti-MPT64. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(4):282-8. doi: 10.1097/PAI.0000000000000300
87. Panteix M. C., Gutierrez M. L., Boschiroli M, Rouviere M, Plaidy A, Pressac D, et al. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France. *J Med Microbiol.* 2010;59:984–9.
88. Horstkotte MA, Sobottka I, Schewe CK, Schäfer P, Laufs R, Rüsck-Gerdes S, et al. *Mycobacterium microti* L lama-type infection presenting as pulmonary tuberculosis in a Human Immunodeficiency Virus-positive patient. *J Clin Microbiol.* 2001;39(1):406–7. doi: 10.1128/JCM.39.1.406–407
89. Fishbein S, van Wyk N, Warren RM, Sampson SL. Phylogeny to function: PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol.* 2015;96(5): 901-16. doi: 10.1111/mmi.12981
90. Tsujimura Y, Yasutomi Y. Allergy vaccines using a *Mycobacterium*-secreted antigen, Ag85B, and an IL-4 antagonist. *Methods Mol Biol.* 2016;1403:723-38.
91. Guo Y, Su Y, Sun Y, Guan W, Yang L, Zhang Z, et al. Ag85B and BCG enhance immune activity of dendritic cells in patients with initially treated tuberculosis. 2016;32(6):816-20.
92. Stavri H, Bucurenci N, Ulea I, Costache A, Popa L, Popa MI. Use of recombinant purified protein derivative (PPD) antigens as specific skin test for tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2012;136(5):799-807.

93. Menon PK, Kapila K, Ohri VC. Recent advances in tuberculosis diagnostic techniques. *Med J Armed Forces India*. 2000;56(2):143–8. doi: 10.1016/s0377-1237(17)30131-4
94. Allerberger F, Fille M, Streif W, Luef G, Schmutzhard E, Dierich MP. Microbiological diagnosis of tuberculosis. *Wien Med Wochenschr*. 1994;144(8-9):156-62.
95. Kim JU, Ryu DS, Cha CH, Park SH. Paradigm for diagnosing mycobacterial disease: direct detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria in clinical specimens using multiplex real-time PCR. *J Clin Pathol*. 2018;71(9):774-80. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204945
96. Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, Schiller I, Laal S, Ramsay A, et al. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2011;8(8):1-19. doi: 10.1371/journal.pmed.1001062
97. Special programme for research training in tropical diseases. Laboratory-based evaluation of 19 commercially available rapid diagnostic tests for tuberculosis: Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008. 71 p.
98. Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis [Text]: Expert World Health Organization Group Meeting Report 22 July 2010, World Health Organization; 2011. 72 p.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70684/1/WHO\\_HTM\\_TB\\_2011.14\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70684/1/WHO_HTM_TB_2011.14_eng.pdf)
99. Phillips PP, Davies GR, Mitchison DA. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *Lancet Infect Dis*. 2010;10:68–9.
100. Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis / *Nat. Rev Immunol*. 2011;11(5):343–54.
101. John SH, Kenneth J, Gandhe AS. Host biomarkers of clinical relevance in tuberculosis: review of gene and protein expression studies. *Biomarkers*. 2012;17:1–8.

102. Ben-Selma W, Boukadida J. Immunochromatographic IgG/IgM test for rapid diagnosis of active tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(12):2090–4.
103. Wang BL, Xu Y, Li ZM, Xu YM, Weng XH, Wang HH. Antibody response to four secretory proteins from *Mycobacterium tuberculosis* and their complex antigen in TB patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9(12):1327-34.
104. Kawajiri K. Isolation of MPB63 in the culture fluid of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo: genetical and immunological characterization. *Kekkaku.* 2003;78(2):69-78.
105. Sannigrahi A, Chall S, Jawed JJ, Kundu A, Majumdar S, Chattopadhyay K. Nanoparticle induced conformational switch between  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet attenuates immunogenic response of MPT63. *Langmuir.* 2018;34(30):8807-17.
106. Horwitz MA, Lee BW, Dillon BJ, Harth G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS.* 1995;92(5):1530-4.
107. Marassi CD, Medeiros L, McNair J, Lilenbaum W. Use of recombinant proteins MPB70 or MPB83 as capture antigens in ELISAs to confirm bovine tuberculosis infections in Brazil. *Acta Trop.* 2011;118(2):101-14.
108. Whelan AO, Clifford D, Upadhyay B, Breadon EL, McNair J, Hewinson GR, et al. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3176-81.
109. Redchuk TA, Korotkevich NV, Kaberniuk AA, Oleinik ES, Labyntsev Alu, Romaniuk SI, et al. Statistical analysis of the distribution of the antibody levels to *Mycobacterium bovis* antigens for bovine tuberculosis diagnostics. *Tsitol Genet.* 2010;44(5):280-5.
110. Silva TR, Petersen AL, Santos T de A, Almeida TF, Freitas LA, Veras PS. Control of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium intracellulare* infections with respect to distinct granuloma formations in livers of BALB/c mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(5):642-8.

111. Whelan AO, Hope JC, Howard CJ, Clifford D, Hewinson RG, Vordermeier HM. Modulation of the bovine delayed-type hypersensitivity responses to defined Mycobacterial antigens by a synthetic bacterial lipopeptide. *Infect Immun.* 2003;71(11):6420-5.
112. Johnson DE, Ai HW, Wong P, Young JD, Campbell RE, Casey JR. Red fluorescent protein ph biosensor to detect concentrative nucleoside transport. *J Biol Chem.* 2009;284(31):20499-0511.
113. Наказ № 40 Міністерства освіти і науки «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» від 12.01.2017. Доступно на: <http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0155-17>
114. Schagger H, Jagow von G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa *Anal Biochem.* 1987;166(2):368-79.
115. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* – 1983;65(1-2):55-63.
116. Ferrari M, Fornasiero MCh, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. *J Immunol Methods.* 1990;13:165-72.
117. Коломієць ОВ, Данилович ЮВ, Данилович ГВ, Костерін СО. Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-обмін у мітохондріях біометрія. *Ukr Biochem J.* 2014;86(3):41-8.
118. Mukai Y, Okamoto T, Kawamura M, Shibata H, Sugita T, Imai S, et al. Optimization of anti-tumor necrosis factor-alpha single chain Fv displayed on phages for creation of functional antibodies. *Pharmazie.* 2006;61(10):889-90.
119. Oliinyk OS, Palyvoda KO, Lugovskaya NE, Kolibo DV, Lugovskoy EV, Komisarenko SV. Recombinant single chain variable fragments antibodies (scFv) against Pro<sup>144</sup>-Leu<sup>155</sup> fragment of human protein C. *Ukr Biochem J.* 2015;87(2):88-94.
120. Oliinyk OS, Kaberniuk AA, Kolibo DV, Komisarenko SV. Isolation and characterization of recombinant single chain variable fragment antibodies (scFv)

- against human heparin-binding EGF-like growth factor. *Biotekhnolohiia*. 2012;5(6):47-56.
121. Редчук ТА, Олійник ОС, Кабернюк АА, Буркальова ДО, Романюк СІ, Колибо ДВ, та ін. Клонування та експресія білків *Mycobacterium bovis* МРВ63 і МРВ83 в клітинах *Escherichia coli*. Доп НАН України. 2007;9:161-6.
122. Редчук ТА, Короткевич НВ, Кабернюк АА, Олійник ОС, Лабинцев АЮ, Романюк СІ, та ін. Рекombінантний химерний протеїн МРВ63-МРВ83 – перспективний антиген для діагностики туберкульозу. *Біотехнологія*. 2010;3(5):50-6.
123. Mustafa S. Th1 cell reactivity and HLA-DR binding prediction for promiscuous recognition of MPT63 (Rv1926c), a major secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol*. 2009;69(3):213-22.
124. Jin J, Samuvel DJ, Zhang X, Li Y, Lu Z, Lopes-Virella MF, et al. Coactivation of TLR4 and TLR2/6 coordinates an additive augmentation on IL-6 gene transcription via p38MAPK pathway in U937 mononuclear cells. *Mol Immunol*. 2011;49(3):423-32.
125. Tyne AS, Chan JG, Shanahan ER, Atmosukarto I, Chan HK, Britton WJ, et al. TLR2-targeted secreted proteins from *Mycobacterium tuberculosis* are protective as powdered pulmonary vaccines. *Vaccine*. 2013;3:31-40.
126. Genberg M, Mark J, Hakelius L, Genberg M. Origin and relationship between different cell types in malignant fibrous histiocytoma. *Am J Pathol*. 1989;135(6):1185-96.
127. Gille C, Spring B, Tewes L. A new method to quantify phagocytosis and intracellular degradation using green fluorescent protein-labeled *Escherichia coli*: comparison of cord blood macrophages and peripheral blood macrophages of healthy adults. *Cytometry A*. 2006;69(3):152-4.
128. Lee K, Oh MH, Lee MS, Nam YS, Park TG, Jeong JH. Stabilized calcium phosphate nano-aggregates using a dopa-chitosan conjugate for gene delivery. *Int J Pharm*. 2013;445(1-2):196-202.

129. Elisabeth VG. Stabilization of calcium phosphate nanoparticles for transfection with nucleic acid drug [doctoral thesis from the internet]: ETH ZURICH. 2012. Diss ETH № 20625 – P.180.
130. Liu Y, Wang T, He F, Liu Q, Zhang D, Xiang S, et al. An efficient calcium phosphate nanoparticle-based nonviral vector for gene delivery. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:721-7.
131. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater*. 2009;8(7):543-57.
132. He Q, Mitchell AR, Johnson SL, Wagner-Bartak C, Morcol T, Bell SD. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(6):899-903.
133. Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol*. 2009;4(10):634-41.
134. Ding HM, Ma YQ. Controlling cellular uptake of nanoparticles with pH-sensitive polymers. *Sci Rep*. 2013;31:2804.
135. Midhat Nabil Ahmad Salimi. Systematic investigations of calcium phosphates produced by wet chemistry method and supercritical processing techniques [Doctor of Philosophy thesis in the Internet]. Edgbaston, Birmingham. University of Birmingham Research Archive, 2013. 186 p.
136. Ea HK, Chobaz V, Nguyen C, Nasi S, van Lent P, Daudon M et al. Pathogenic role of basic calcium phosphate crystals in destructive arthropathies. *Plos One*. 2013;8(2):e57352.
137. Maitra A. Calcium phosphate nanoperticles: second-generation non viral vectors in gene therapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(6):893-905.
138. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaM beta2. *J Biol Chem*. 2005;280(2):1336-45.

139. Ross GD, Větvicka V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol.* 1993;92(2):181-94.
140. Ehlers MR. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect.* 2000;2(3):289-94.
141. Schlesinger LS, Azad AK, Torrelles JB, Roberts E, Vergne I, Deretic V. *Handbook of tuberculosis: immunology and cell biology: Determinants of phagocytosis, phagosome biogenesis and autophagy for Mycobacterium tuberculosis.* Weinheim, Germany: Edited by Kaufmann Sh.E., Britton W.J. Wiley-VCH; 2017. 460 p.
142. Lundahl J, Halldén G, Sköld CM. Human blood monocytes, but not alveolar macrophages, reveal increased CD11b/CD18 expression and adhesion properties upon receptor-dependent activation. *Eur Respir J.* 1996;9(6):1188-94.
143. Cassado AA. Major macrophage marker: the case of the peritoneum and spleen. *Results Probl Cell Differ.* 2017;62:161-79. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0\_7
144. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem.* 1997;249(1):24–8.
145. Salgame P. MMPs in tuberculosis: granuloma creators and tissue destroyers. *J Clin Invest.* 2011;121(5):1686-8.
146. Taylor JL, Hattle JM, Dreitz SA, Trout JM, Izzo LS, Basaraba RJ et al. Role for matrix metalloproteinase 9 in granuloma formation during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun.* 2006;74(11):6135–44.
147. Ganguly N, Giang PH, Basu SK, Mir FA, Siddiqui I, Sharma P. *Mycobacterium tuberculosis* 6-kDa Early Secreted Antigenic Target (ESAT-6) protein downregulates Lipopolysaccharide induced c-myc expression by modulating the Extracellular Signal Regulated Kinases ½. *BMC Immunol.* 2007;8:24. doi:10.1186/1471-2172-8-24

148. Saraav I, Singh S, Sharma S. Outcome of *Mycobacterium tuberculosis* and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion? *Immunol Cell Biol.* 2014;92(9):741-6.
149. Sittisart P, Chitsomboon B, Kaminski NE. *Pseuderanthemum palatiferum* leaf extract inhibits the proinflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-6 expression in LPS-activated macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2016;97:11-22.
150. Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R, Gennaro ML. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 1998;66(11):5344-9.
151. Державна служба статистики України. Статистична інформація: сільське, лісове, рибне господарство.  
Доступно на: <http://www.ukrstat.gov.ua/>
152. Lugini L, Lozupone F, Matarrese P, Funaro C, Luciani F, Malorni W. Potent phagocytic activity discriminates metastatic and primary human malignant melanomas: a key role of ezrin. *Lab Invest.* 2003;83(11):1555–67.
153. Lahey T, Sheth S, Matee M, Arbeit R, Horsburgh CR, Mtei L, et al. Interferon-gamma responses to mycobacterial antigens protect against subsequent HIV-associated tuberculosis. *J Infect Dis.* 2010;202(8):1265–72. doi: 10.1086/656332.
154. 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.
155. 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.
156. 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.

157. 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.
158. 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.

## ДОДАТОК 1

### СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

#### *Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації*

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.
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.
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.
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.

#### *Наукові праці, які зісвідчують апробацію матеріалів дисертації*

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 (публікація тез).

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 **(публікація тез)**.

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 **(усна доповідь)**.

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 **(публікація тез)**.

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 **(усна доповідь)**.

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

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

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 (усна доповідь).

### ***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.