

На правах рукописи

**БАРАНОВА Наталья Борисовна**

**ПЕРСИСТЕНЦИЯ *Mycoplasma hominis* У ЧЕЛОВЕКА:  
ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ И  
ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ МИКОПЛАЗМЫ НА СТРЕССОРЫ**

03.02.03 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2010

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ патогенеза Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор  
Чернова Ольга Александровна

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор  
Поздеев Оскар Кимович  
(Казанский государственный  
медицинский университет, г. Казань)

кандидат биологических наук, доцент  
Гимадутдинов Олег Александрович  
(ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский)  
Федеральный университет», г. Казань)

**Ведущая организация:**

ФГУН «Казанский научно-  
исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии»,  
г. Казань.

Защита состоится «28» октября 2010 года в «13<sup>00</sup>» часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского университета.

Автореферат разослан «\_\_\_» сентября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор



Абрамова З.И.

**Актуальность проблемы.** Выяснение механизмов, определяющих персистенцию *Mycoplasma hominis* – одной из наиболее распространенных микоплазм, ассоциированной с социально-значимыми заболеваниями человека, являющейся также контаминантом клеточных культур, используемых в биотехнологии для производства вирусных вакцин, представляет значительный интерес как с точки зрения фундаментальных исследований, так и практических разработок, связанных с определением молекулярно-генетических основ формирования системы «паразит-хозяин» и способов ее контроля [Борхсениус и др., 2002; Waites *et al.*, 2005].

В организме человека *M. hominis* способна вызывать развитие как урогенитальных, так и экстрагенитальных острых и хронических, локальных и системных инфекций аппаратного и инаппаратного типов. Урогенитальные микоплазменные инфекции могут обуславливать осложнения беременности, патологию и гибель плода [Прозоровский и др., 1995; Поздеев, 2004; Razin, Herrmann, 2002; Waites *et al.*, 2005; Egawa *et al.*, 2007]. Контроль микоплазменной инфекции представляет серьезную проблему, решение которой связывают с успехами изучения молекулярных основ адаптации микоплазмы к стрессорным воздействиям и восприимчивости индивидов к персистенции *M. hominis* [Борхсениус и др., 2002; Razin, 2006].

Факторы, обуславливающие персистенцию патогенных бактерий у млекопитающих и человека, в значительной мере определяются особенностями биологии инфекционного агента и организма-хозяина [Прозоровский и др., 1995; Lysnyansky *et al.*, 2001a; Wise *et al.*, 2006]. Гены иммунного ответа организма-хозяина, а также иммунодоминантных и стресс-индуцированных белков инфекционного агента имеют при этом существенное значение [Yogev *et al.*, 2002; Rhen *et al.*, 2003; Razin, 2006; Hamsten *et al.*, 2008]. Показано, что восприимчивость к персистенции ряда патогенных микроорганизмов у человека может быть связана с наличием у индивидов определенных генотипов инфекционных агентов, а также полиморфных локусов генов ключевых иммуномодуляторов про- и противовоспалительных реакций – *IL-1* (*IL-1B-511C>T*, *IL-1B+3954C>T*, *IL-1RN(VNTR)*) и *IL-10* (*IL-10-1082G>A*) [Rad *et al.*, 2004; Mege *et al.*, 2006]. Изменения экспрессии генома, морфологии, ультраструктуры, пролиферации и вирулентности бактерий в ответ на воздействие стрессоров обуславливают адаптацию микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды (НУС) и их персистенцию [Головлев, 1998; Чернов и др., 2007, 2008a, 2009, 2010; Muela *et al.*, 2008; Madsen *et al.*, 2006a, 2006b; Schafer *et al.*, 2007; Folmsbee *et al.*, 2010]. Результаты комплексных исследований генов иммунного ответа организма-хозяина, а также иммунодоминантных и стресс-индуцированных белков инфекционного агента могут использоваться для определения механизмов выживания патогенов в различных условиях среды (РУС) и способов контроля их персистенции, а также разработки региональных программ и индивидуальных схем лечения заболеваний, ассоциированных с персистенцией микроорганизмов. Однако данные о

проведении соответствующих исследований в отношении *M. hominis* отсутствуют.

**Цель данной работы** – выявление факторов восприимчивости к микоплазменной инфекции и особенностей ответных реакций клеток *M. hominis* PG37 на стрессорные воздействия.

**Основные задачи исследования:**

1. Протестировать клинический материал на наличие *M. hominis* с помощью ПЦР и определить частоту встречаемости микоплазмы у индивидов с отягощенным акушерским анамнезом (жители г. Казани).

2. Определить варианты *IL-1* (*IL-1B-511C>T*, *IL-1B+3954C>T*, *IL-1RN(VNTR)*) и *IL-10* (*IL-10-1082G>A*) у инфицированных и не инфицированных *M. hominis* индивидов и провести анализ распределения частоты их встречаемости в обследуемых группах.

3. Определить нуклеотидные последовательности *vaa*-гена у клинических изолятов *M. hominis* и выяснить особенности вариабельности гена, кодирующего фактор вирулентности микоплазмы – цитоадгезин *Vaa*.

4. Провести сравнительный анализ морфологии, ультраструктуры и пролиферации клеток *M. hominis* PG37, образующихся в различных условиях среды – оптимальных и стрессовых.

5. Провести сравнительный анализ метрических параметров ДНК, а также матричных свойств молекулы в отношении амплификации нуклеотидных последовательностей генов у клеток *M. hominis* PG37, образующихся в различных условиях среды.

6. Провести сравнительный анализ токсигенности *M. hominis* PG37 при культивировании микоплазмы в различных условиях среды.

7. Провести сравнительный протеомный анализ клеток *M. hominis* PG37, образующихся в различных условиях среды.

**Научная новизна.** Впервые проведены комплексные исследования факторов, определяющих персистенцию *M. hominis* у человека. С помощью ПЦР определены встречаемость *M. hominis* у пациентов с отягощенным акушерским анамнезом (ОАА), особенности распределения генотипов полиморфных локусов генов ключевых цитокинов у инфицированных и не инфицированных микоплазмой индивидов – жителей г. Казани, а также вариабельности у клинических изолятов *M. hominis vaa*-гена, кодирующего фактор вирулентности микоплазмы – цитоадгезин *Vaa*.

Впервые выявлены молекулярно-генетические маркеры предрасположенности к инфицированию *M. hominis*. Установлено, что аллель *IL-1B+3954\*C* и генотипы *IL-1B+3954\*C/\*C* и *IL-10-1082\*G/\*G* повышают риск персистенции *M. hominis*, а генотипы *IL-1B-511\*T/\*T* / *IL-1RN\*1/\*1* и *IL-1B+3954\*C/\*T* / *IL-1RN\*1/\*2* снижают вероятность микоплазменной инфекции. В нуклеотидных последовательностях *vaa*-гена, кодирующих сайты адгезии и иммунозначимую зону белка, установлен гипервариабельный участок.

Впервые показано, что в результате длительного пребывания *M. hominis* PG37 в

стрессовых условиях происходит переход бактерии в некультивируемое состояние (НС); в культуре микоплазмы достоверно возрастает количество ультрамикроформ (УМФ) – сферических, окруженных мембраной наноструктур (диаметр < 0,2 мкм).

Впервые установлено, что *M. hominis* PG37 обладает генотоксичностью, проявление которой в стрессовых условиях имеет особенности. Показано, что клетки *M. hominis* PG37, образующиеся при длительном культивировании в стрессовых условиях, и их культуральная жидкость не оказывают ДНК-повреждающего действия на клетки тестерного штамма *Escherichia coli* PQ37.

Впервые выполнен сравнительный протеомный анализ клеток *M. hominis* PG37, образующихся в РУС, и идентифицированы 53 белка, участвующих в ответных реакциях микоплазмы на действия стрессоров (ТШ, СДС).

**Научно-практическая значимость.** Полученные данные вносят вклад в понимание адаптации *M. hominis* PG37 к стрессовым условиям, представления о молекулярно-генетических аспектах персистенции микоплазмы у человека и их региональных особенностях.

В работе выявлены генетические маркеры предрасположенности индивидов (жители г. Казани) к персистенции *M. hominis* – бактерии, ассоциированной с заболеваниями репродуктивной системы человека, а также являющейся контаминантом клеточных культур, использующихся, в том числе в биотехнологии для производства вирусных вакцин, и предложен диагностический зонд, позволяющий не только идентифицировать различные штаммы *M. hominis*, но и выявлять экспресс-методом ПЦР культивируемые и некультивируемые формы бактерии.

Идентифицированные в результате протеомного анализа стресс-реактивные белки *M. hominis* PG37 могут быть использованы для определения молекулярно-генетических механизмов адаптации микоплазмы к стрессовым условиям, а также способов контроля микоплазменной инфекции.

Полученные результаты могут найти применение в медицине для разработки дифференцированных программ, индивидуальных схем лечения и профилактики заболеваний, ассоциированных с *M. hominis*.

Данные работы могут быть использованы также в курсах лекций по микробиологии, молекулярной генетике, иммунологии инфекционных процессов и молекулярной медицине в ВУЗах.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование.** Работа проводилась в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Взаимодействие микоплазм и эукариот: молекулярно-генетические основы образования некультивируемых форм бактерий и формирования системы «паразит-хозяин»» (№ гос. рег. 01200901965) при финансовой поддержке РФФИ (проект № 01-04-49008); фонда НИОКР РТ (№ 03-3.10-163/2002-2004); Государственных контрактов № 35-405/06 на выполнение научно-исследовательских работ, а также № 02.740.11.0391 в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. Научные

положения диссертации базируются на результатах собственных исследований автора. Синтез праймеров, секвенирование нуклеотидных последовательностей, двумерный электрофорез и идентификацию полипептидов проводили в ФГУ «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России (г. Москва); оценку токсических и генотоксических свойств клеток *M. hominis* PG37, а также наноскопию молекул ДНК проводили в КФУ (биолого-почвенный факультет, кафедра микробиологии; физический факультет, кафедра оптики и нанофотоники) (г. Казань). Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам ФГУ «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России – д.б.н., проф. В.М. Говоруно, к.х.н. Т.А. Акопиан, М.А. Роговой, к.б.н. М.В. Серебряковой, В.А. Карпову и сотрудникам КФУ – д.б.н., проф. О.Н. Ильинской, к.б.н. Н.И. Акберовой, к.ф.-м.н. О.А. Коноваловой, к.б.н. А.Б. Маргулис за предоставленную возможность проведения совместных работ и помощь в экспериментах.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Аллель *IL-1B+3954\*C*, а также генотипы *IL-1B+3954\*C/\*C* и *IL-10-1082\*G/\*G* повышают риск персистенции *M. hominis*, а генотипы *IL-1B-511\*T/\*T / IL-1RN\*1/\*1* и *IL-1B+3954\*C/\*T / IL-1RN\*1/\*2* снижают вероятность микоплазменной инфекции.
2. Клинические изоляты *M. hominis* варьируемы по первичной структуре и модульной организации гена, кодирующего цитоадгезин *Vaa*. Нуклеотидные последовательности *vaa*-гена у клинических изолятов микоплазмы содержат гипервариабельный участок, ассоциированный с иммунозначимой зоной белка.
3. Условия культивирования *M. hominis* PG37 влияют на пролиферацию культуры, а также морфологию, ультраструктуру клеток микоплазмы и соотношение клеточных морфотипов в популяции бактерии.
4. *M. hominis* PG37 обладает генотоксичностью, проявление которой в стрессовых условиях имеет особенности.
5. Различные виды стрессоров индуцируют у *M. hominis* PG37 изменение экспрессии как специфичных, так общих белков.

#### **Апробация работы:**

Основные результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции «Медицинская микробиология – XXI век» (Саратов, 2004); 10-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2006); Итоговой научной конференции КИББ КазНЦ РАН (Казань, 2007); Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2007); Всероссийской конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты исследования симбиотических систем» (Саратов, 2007); 11-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2007); IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы в биотехнологии» (Казань, 2008), XIV Международной

конференции «Ферменты микроорганизмов в биотехнологии и медицине» (Казань, 2009), Российской конференции «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 193 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы, а также приложения. В работе представлено 12 таблиц и 41 рисунок. Список цитируемой литературы содержит 363 источника, из них 93 – в отечественных изданиях.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Материалы и методы исследований

Клинический материал (соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала и уретры) был получен из клиники кафедры акушерства и гинекологии Казанской медицинской академии (г. Казань, Россия); образцы ДНК (299 индивидов; 149 женщин ( $27,77 \pm 7,51$ ) и 150 мужчин ( $30,01 \pm 8,42$ )) – из акушерско-гинекологического центра ООО «Здоровье семьи» (г. Казань, Россия); образцы ДНК (79 индивидов) – из анонимного кабинета Республиканского клинического кожно-венерологического диспансера Министерства здравоохранения Республики Татарстан (г. Казань, Россия). Штамм *Mycoplasma hominis* PG37 был любезно предоставлен профессором И.В. Раковской из коллекции микроорганизмов Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (РАМН, г. Москва).

**Культивирование *M. hominis* PG37** проводили на искусственных питательных средах как описано в [Freundt *et al.*, 1979], с модификациями. Исследовались ответные реакции *M. hominis* PG37 на основные стрессоры, воздействие которых микоплазма претерпевает в связи с особенностями условий ее обитания – окислительный стресс (ОС) и тепловой шок (ТШ), а также совокупное действие стрессоров (СДС) – изменение температуры среды и ограничение субстрата. Инкубацию клеток *M. hominis* PG37 (поздняя log-фаза) с перекисью водорода (ОС) проводили в присутствии 5 мкМ и 500 мкМ  $H_2O_2$  [Hallamaa *et al.*, 2008]. ТШ для клеток *M. hominis* PG37 проводили в условиях повышения температуры до  $+42^\circ C$  [Борхсениус и др., 2008]. Культивирование клеток в условиях СДС проводили в соответствии с алгоритмом индукции НС у *M. gallisepticum* S6, разработанным ранее сотрудниками лаборатории молекулярных основ патогенеза КИББ КазНЦ РАН [Чернов и др., 2008a], связанным (в случае *M. hominis*) с исключением из среды свободного аргинина. Клетки культуры *M. hominis* PG37, выращенной в оптимальных условиях – на полноценной питательной среде Эдварда (ППСЭ) при  $+37^\circ C$ , составили контрольные образцы, а клетки микоплазмы, подвергшиеся воздействию неблагоприятных факторов (ОС, ТШ, СДС), – опытные.

**Численность колониеобразующих единиц (КОЕ) *M. hominis* PG37** определяли высевом бактериальной суспензии в соответствующих разведениях на 0,4% агаризованные питательные среды [Пименова и др., 1983].

**Трансмиссивную электронную микроскопию** клеток микоплазмы проводили по Cole [1983]. Ультратонкие срезы получали на микротоме ЛКВ-III (Швеция). Образцы просматривали на электронном микроскопе JEM-1200EX (Япония).

**Атомно-силовую микроскопию ДНК *M. hominis* PG37** проводили по Braga, Ricci [2004]. Исследование образцов ДНК проводили на атомно-силовом микроскопе Solver P47H («НТ-МДТ», Россия). Для обработки данных использовали программу Nova 1.0.26 RC1 (разработчик – «НТ-МДТ», Россия).

**Определение токсичности и генотоксичности** клеток *M. hominis* PG37 и их культуральной жидкости проводили по Quillardet *et al.* [1982].

**Выделение ДНК** из клинических образцов и клеток микоплазм осуществляли с помощью метода фенольной экстракции [Маниатис и др., 1984], а также коммерческого набора «ДНК-экспресс» («Литех», Россия), согласно инструкции фирмы-изготовителя. Дополнительно препараты ДНК обрабатывали РНКазой («Seriva», ФРГ) и протеиназой К («Хеликон», Россия).

**Детекцию клинических образцов на наличие ДНК *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis*** проводили с использованием коммерческих наборов реагентов НПФ «Литех» (Россия), согласно инструкции фирмы-изготовителя.

**Направленную амплификацию нуклеотидных последовательностей генов *M. hominis* PG37** посредством ПЦР проводили с использованием праймеров, сконструированных на основе последовательности *vaa*-гена, согласно Voesen *et al.* [1998], а также генов *dnaK*, *gyrA*, *gyrB*, *parE*, *parC*, *tuf*, *arcA*, *rrlA*, *rrlB* микоплазмы. Олигонуклеотиды синтезировали в НПФ «Литех» (Россия). Рестрикцию *vaa*-ампликонов *M. hominis* проводили с использованием рестриктаз *Hin61* и *HindIII* («Fermentas», Литва). Анализ ПЦР-продуктов и их рестрикции осуществляли с помощью электрофоретического разделения фрагментов ДНК в 2% агарозном геле («Хеликон», Россия) с последующим окрашиванием бромистым этидием (10 мг/мл).

**Определение генотипов полиморфных локусов генов *IL-1* и *IL-10*** осуществляли методом ПЦР по El-Omar *et al.* [2000], Garcia-Gonzalez *et al.* [2003] и Karhukorpi [2005]. Рестрикцию ампликонов *IL-1B-511C>T* и *IL-1B+3954C>T* проводили по Garcia-Gonzalez *et al.* [2003], с использованием специфичных эндонуклеаз *AvaI* и *TaqI* соответственно.

**Секвенирование фрагментов ДНК** осуществляли с помощью автоматического секвенатора ABI 3130 («Applied Biosystems», США), согласно инструкции изготовителя.

**Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей** проводили с использованием пакета программ Informax Vector NTI Suite 9. Расчет размеров ампликонов и рестрикционных фрагментов проводили с помощью программы DNASIS (v. 3.0). Поиск доменов проводили в BLAST

[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi/>], SwissProt [<http://cn.expasy.org/>], Pfam [<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>], PROSITE scan [[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_prosite.html/](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html/)], InterProScan [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>], SMART [<http://smart.embl-heidelberg.de/>], PROSITE [<http://cn.expasy.org/prosite/>], FINGERPRINTScan [<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/fingerPRINTScan/>]. Для предсказания и анализа вторичной структуры белков Vaa применяли программные средства NPSA (**N**etwork **P**rotein **S**equence **A**nalysis, <http://npsa-pbil.ibcp.fr>) с использованием методов SOPM (**S**elf-**O**ptimized **P**rediction **M**ethod) и Coiled-coil prediction [Geourjon, Deléage, 1994; Lupas *et al.*, 1991], а также данные Boesen *et al.* [2001]. Расчет  $\alpha$ -спиралей (h),  $\beta$ -структур (e) и суперспиралей (c) проводили при значениях window – 14, 21 и 28.

**Выделение, дифференциальное окрашивание флуоресцентными красителями (CyDye3-DIGE, CyDye5-DIGE), разделение с помощью двумерного электрофореза, а также идентификацию методом масс-спектрометрии белков** проводили по Деминой и др. [2009] и Viswanathan *et al.* [2006]. Белки идентифицировали с использованием программы Mascot Peptide Fingerprint (Matrix Science, Великобритания) и базы данных NCBI (US **N**ational **C**enter for **B**iotechnological **I**nformation, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Сравнительный анализ белковых спектров выполняли с использованием программы Phoretix 2D Advanced (v. 6.01).

**Статистическую обработку данных** выполняли с использованием программного обеспечения MS Excel (Microsoft), программы MedCalc (v. 8.1.1.0) и Origin 8.0. Описательная статистика количественных признаков представлена средними и стандартными отклонениями ( $M \pm s$ ). Сравнение средних значений проводили по критерию Стьюдента. При сравнении частот аллелей, генотипов и комбинаций генотипов обследуемых, а также количества клеток в классах использовали критерий  $\chi^2$  ( $p$ ) с поправкой Йейтса на непрерывность, а также точный критерий Фишера для сравнения значений меньше 5. Достоверность различий оценивали с помощью 95% доверительного интервала для генерального значения частоты, который вычисляли с помощью точной формулы с использованием  $F$ -распределения [Животовский, 1991]. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . При множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони [Гланц, 1999]. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов ( $OR$ ), а также рассчитывали его 95%-ный доверительный интервал (95% CI) [Бабич и др. 2005].

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1. Частота встречаемости *M. hominis* у индивидов с отягощенным акушерским анамнезом

В результате тестирования клинического материала на наличие *M. hominis* с помощью ПЦР было обнаружено, что слизистые оболочки урогенитального тракта 30,95% индивидов с ОАА (35,55% женщин в группе индивидов, пол которых

документировался) инфицированы *M. hominis*. У 14,53% инфицированных *M. hominis* индивидов с ОАА были выявлены клинически значимые коинфекции – *U. urealyticum* (76,47%), *C. trachomatis* (5,88%), *T. vaginalis* (17,65%). 5,13% инфицированных *M. hominis* индивидов с ОАА являлись носителями одновременно трех инфекционных агентов (*M. hominis*+*U. urealyticum*+*C. trachomatis*; *M. hominis*+*U. urealyticum*+*T. vaginalis* и *M. hominis*+*C. trachomatis*+*T. vaginalis*).

Полученные нами результаты в отношении частоты встречаемости *M. hominis* у индивидов с ОАА отличаются от данных, полученных для некоторых этно-географических групп [Зяблицев и др., 2002; Зоерман, 2007; Doh *et al.*, 2004]. Это может быть связано с региональными особенностями распространения микоплазмы.

## 2.2. Распределение частоты встречаемости вариантов *IL-1* (*IL-1B-511C>T*, *IL-1B+3954C>T* и *IL-1RN(VNTR)*) и *IL-10* (*IL-10-1082G>A*) у инфицированных и не инфицированных *M. hominis* индивидов

В результате анализа распределения полиморфных локусов генов цитокинов (*IL-1* и *IL-10*) было обнаружено, что у инфицированных *M. hominis* индивидов достоверно чаще встречаются аллель *IL-1B+3954\*C* (82,0% против 74,1%;  $\chi^2=4,19$ ;  $p=0,041$ ), генотип *IL-1B+3954\*C/\*C* (65,0% против 50,8%;  $\chi^2=4,84$ ;  $p=0,028$ ), а также генотип *IL-10-1082\*G/\*G* (13,9% против 3,8%;  $\chi^2=5,09$ ;  $p=0,024$ ) (рис. 1).

Согласно результатам расчетов, носительство аллеля *IL-1B+3954\*C*, генотипа *IL-1B+3954\*C/\*C*, а также генотипа *IL-10-1082\*G/\*G* является фактором риска персистенции *M. hominis* в организме человека ( $OR = 1,59$ , 95% CI = 1,04–2,40;  $OR = 1,80$ , 95% CI = 1,09–2,96;  $OR = 4,02$ ; 95% CI = 1,29–12,53 соответственно).

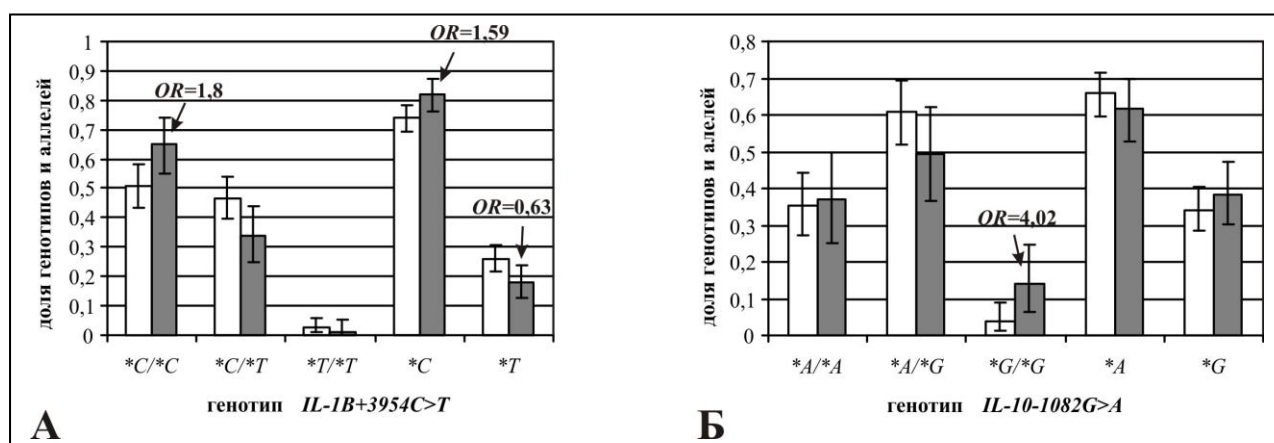


Рис. 1. Распределение аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *IL-1B+3954C>T* (А) и *IL-10-1082G>A* (Б) у индивидов, не инфицированных (□) и инфицированных (■) *M. hominis*.

Статистически значимые различия в обследуемых группах в отношении встречаемости версий генотипов и аллелей *IL-1B-511C>T*, *IL-1RN(VNTR)* в наших исследованиях не обнаружены ( $p > 0,05$ ).

У индивидов, не инфицированных *M. hominis*, достоверно чаще встречаются

комбинации генотипов *IL-1B-511\*T/\*T / IL-1RN\*1/\*1* (5,9% против 0,9%;  $p=0,044$ ), а также *IL-1B+3954\*C/\*T / IL-1RN\*1/\*2* (22,8% против 11,8%;  $\chi^2=4,08$ ;  $p=0,043$ ) (рис. 2, 3). В отношении ассоциации полиморфных локусов  $-511C>T$  и  $+3954C>T$  гена *IL-1B* статистически значимые различия не обнаружены ( $p > 0,05$ ).

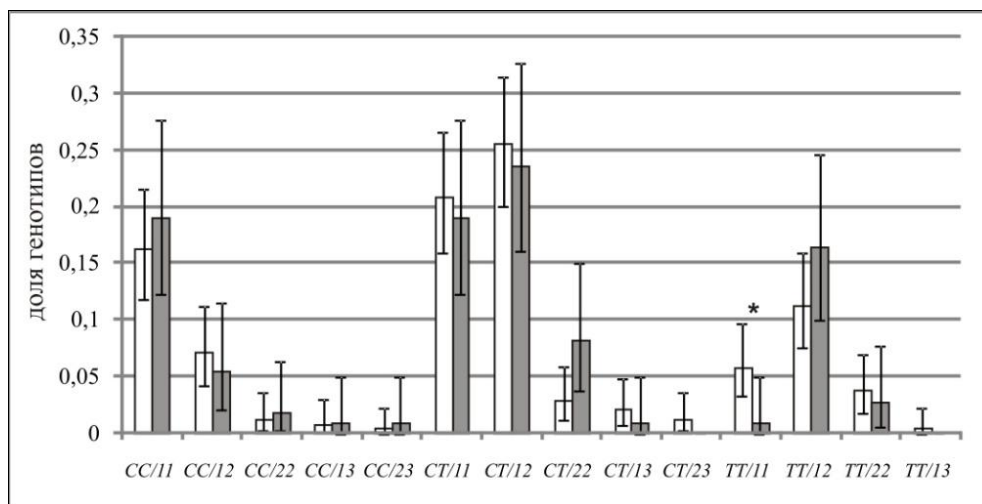


Рис. 2. Распределение комбинаций генотипов по полиморфным локусам генов *IL-1B-511C>T* и *IL-1RN(VNTR)* у индивидов, не инфицированных (□) и инфицированных (■) *M. hominis*. \* –  $p < 0,05$ .

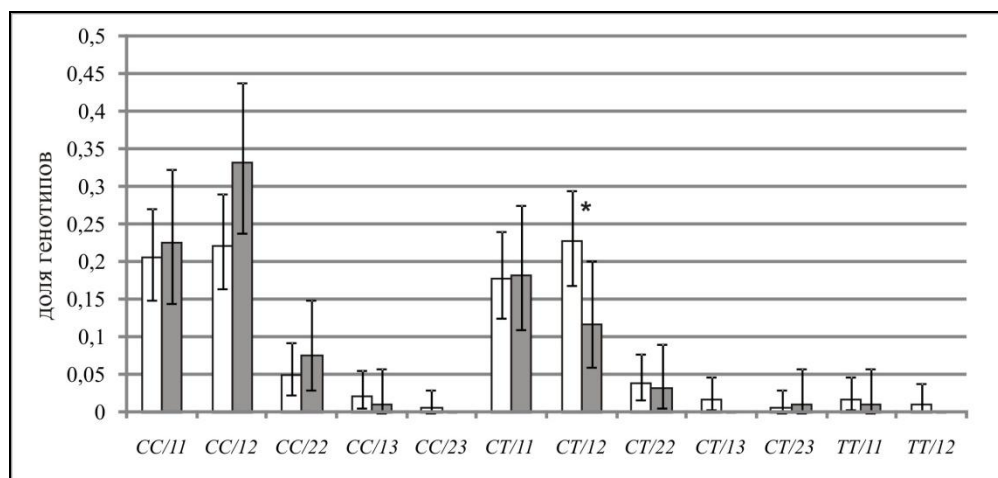


Рис. 3. Распределение комбинаций генотипов полиморфных локусов генов *IL-1B+3954C>T* и *IL-1RN(VNTR)* у индивидов, не инфицированных (□) и инфицированных (■) *M. hominis*. \* –  $p < 0,05$ .

Статистически значимые различия в обследуемых группах одновременно по всем трем исследуемым полиморфным локусам генов *IL-1B* ( $-511C>T$  и  $+3954C>T$ ) и *IL-1RN(VNTR)*, а также в отношении комбинаций генотипов полиморфных локусов генов *IL-1* (*IL-1B* ( $-511C>T$  и  $+3954C>T$ ) и *IL-1RN(VNTR)*) и *IL-10* (*IL-10-1082G>A*) – антагонистических (по «активации – ингибции» иммунного ответа) цитокинов тоже не были выявлены ( $p > 0,05$ ).

Полученные нами результаты свидетельствуют, что генотипы, определяющие

повышенный уровень секреции провоспалительного цитокина IL-1 и высокий уровень секреции противовоспалительного цитокина IL-10, способствуют персистенции *M. hominis*. Это согласуется с особенностями взаимодействия микоплазм с иммунной системой человека, определяющими персистенцию этих бактерий и связанные с нею сочетанные инфекции [Прозоровский и др., 1995; Поздеев, 2004]. Генотипы полиморфных локусов генов IL-1 и IL-10, обуславливающие повышенный уровень секреции про- и противовоспалительного цитокинов, были выявлены у 60,9% пациентов с сочетанными инфекциями, в том числе у 100,0% индивидов, являющихся носителями одновременно 3-х патогенных микроорганизмов [гл. 2.1].

Вопрос об ассоциации вариантов полиморфных локусов генов цитокинов IL-1 и IL-10 и инфицирования микоплазмами мало изучен [Орлова и др., 2007; Jermias *et al.*, 1999; Van der Schee *et al.*, 2001]. Ассоциация генотипов ключевых иммуномедиаторов с инфицированием *M. hominis* впервые была исследована в нашей работе. Гетерогенность группы инфицированных *M. hominis* по полиморфным вариантам *IL-1* и *IL-10* может свидетельствовать об участии также других (помимо исследованных) факторов в восприимчивости индивидов к персистенции *M. hominis*.

### 2.3. Особенности структуры *vaa*-гена у клинических изолятов *M. hominis*

В результате анализа электрофоретического разделения ПЦР-продуктов, образованных при направленной амплификации нуклеотидных последовательностей *vaa*-гена у 12 клинических изолятов микоплазмы, были выявлены 2 типа ампликонов – длиной 1150 н.п.о. и 1480 н.п.о. и установлено, что спектр рестрикционных фрагментов соответствующих ампликонов различается.

В результате определения и сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей *vaa*-гена у клинических изолятов *M. hominis* было обнаружено, что первичная структура соответствующего гена имеет высокую степень гомологии (92-99 %) с таковой коллекционных штаммов **FBG** (X73834), **4195** (AJ001652) и **132** (AJ001651) микоплазмы. Согласно модульной организации гена, 6 из 12 клинических изолятов соответствуют штамму **132**, 5 – **FBG**, а 1 – **4195**.

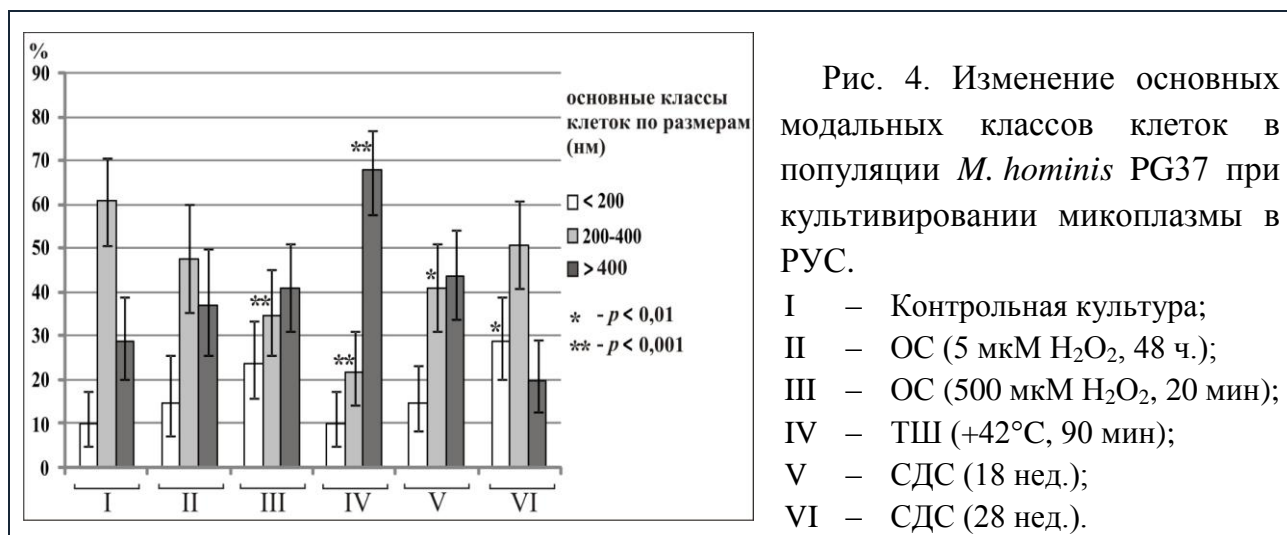
Клинический изолят **28**, как и штамм **4195**, имеет уникальную структурную организацию гена *Vaa* [Boesen *et al.*, 1998]. Нуклеотидная последовательность гена включает модуль VII, обнаруженный ранее в *vaa*-гене *M. hominis* штамма **1620**, выделенного в США из суставной жидкости больного [Olson *et al.*, 1991], и модуль V, характерный для *vaa*-гена *M. hominis* штамма **FBG**, выделенного в Германии из урогенитального тракта индивида [Feldmann *et al.*, 1992]. Степень гомологии выявленного нами изолята *M. hominis* **28** и коллекционного штамма **4195** составляет 98%. Выявление изолятов *M. hominis* с версиями *vaa*-гена, объединяющими модульный состав, характерный для различных штаммов *M. hominis*, установленных в разных этно-географических группах, при отсутствии каких-либо дубликаций *vaa*-гена или его фрагментов в геноме, а также наличие последовательностей для узнавания сайт-специфической рекомбиназы в структуре модулей позволяют

предполагать вовлечение механизма ДНК-трансформации в антигенную вариабельность Vaa.

В V модуле *vaa*-гена у клинических изолятов, а также коллекционных штаммов *M. hominis* нами была обнаружена высокая частота значимых нуклеотидных замен (отношение количества нуклеотидных замен, сопровождающихся заменой аминокислоты, к общему количеству нуклеотидных замен в модульной последовательности *vaa*-гена у разных изолятов микоплазмы составляет 0,67 – 0,70). В нуклеотидной последовательности V модуля был выявлен гипервариабельный участок, ассоциированный с иммунозначимой зоной белка (плотность значимых нуклеотидных замен – 0,33, по сравнению, с 0,00 – 0,17 в остальных районах модуля). Аминокислотные последовательности, соответствующие гипервариабельному участку *vaa*-гена, ассоциированы с районами суперспиралей и петель Vaa. По данным Boesen *et al.* [2001], эти последовательности являются мишенями антигенраспознающих рецепторов, обуславливают взаимодействие с мембранами клетки хозяина и, соответственно, являются критичными для преодоления иммунного контроля и персистенции микоплазмы в организме хозяина.

#### 2.4. Особенности морфологии и ультраструктуры клеток *M. hominis* PG37, образующихся в различных условиях среды

В результате исследования ультратонких срезов клеточных осадков *M. hominis* PG37 с помощью трансмиссивной электронной микроскопии было обнаружено, что условия культивирования *M. hominis* PG37 влияют на пролиферацию культуры, а также морфологию, ультраструктуру клеток микоплазмы и соотношение клеточных морфотипов в популяции бактерии (рис. 4).



Популяция контрольной культуры *M. hominis* PG37, выращенной в оптимальных условиях, представлена в основном «типичными» клетками микоплазмы. Это сферические клетки с умеренно плотной цитоплазмой и размером 0,2 – 0,4 мкм. Помимо «типичных» клеток, в популяции встречаются клетки с повышенной

электронной плотностью и клетки, линейный размер которых превышает 0,4 мкм. В контрольной культуре обнаруживаются также УМФ – сферические, окруженные мембраной наноструктуры (диаметр < 0,2 мкм), которые могут соответствовать как наноклеткам бактерии, так и мембранным везикулам, определяющим у грамположительных и грамотрицательных бактерий секрецию белков, межклеточные взаимодействия и патогенез [Lee *et al.*, 2009].

При культивировании *M. hominis* PG37 в стрессовых условиях (ОС – 500 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 мин; ТШ и СДС – 18 нед.) было обнаружено статистически значимое снижение (относительно контроля) количества «типичных» клеток микоплазмы ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). В случае ТШ также было зарегистрировано увеличение количества клеток размером более 0,4 мкм ( $p < 0,001$ ). В случае ОС (5 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 48 ч.; 500 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 мин) и СДС (18 и 28 нед.) в культуре бактерии было установлено возрастание УМФ, однако разница с контролем оказалась статистически значимой ( $p < 0,01$ ) только в случае СДС (28 нед.) (рис. 4).

Результаты исследований влияния условий культивирования *M. hominis* PG37 на способность микоплазмы к колониеобразованию на агаризованной среде свидетельствуют, что эта бактерия весьма устойчива к ОС (КОЕ/мл –  $1,6 \times 10^7$  (5 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 мин),  $4,2 \times 10^8$  (500 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 мин) в опытах по сравнению с  $5,0 \times 10^7$  и  $3,5 \times 10^8$  в контролях соответственно), но чувствительна к ТШ (КОЕ/мл –  $4,7 \times 10^2$  в опыте по сравнению с  $3,5 \times 10^8$  в контроле).

При статическом культивировании в условиях СДС *M. hominis* PG37 теряет способность к колониеобразованию через 8 суток после переноса с ППСЭ. Однако, по данным электронной микроскопии, ПЦР и протеомного анализа, неповрежденные клетки *M. hominis* PG37, а также ДНК микоплазмы сохраняются на протяжении всего срока наблюдения за культурой бактерии в НУС, что свидетельствует о переходе бактерии в НС.

Попытки «пробуждения» клеток *M. hominis* PG37 после длительного культивирования в условиях СДС оказались неэффективными. Известно, что при отмене неблагоприятных условий «пробуждение» бактериальных клеток из НС в пролиферирующее состояние может требовать особых условий в каждом конкретном случае [Головлев, 1998]. Для некоторых бактерий единственным эффективным способом реверсии является пассаж через восприимчивый организм [Романова, Гинцбург, 1998]. Для реверсии клеток *M. hominis* PG37 из НС, вызванного статическим культивированием в условиях СДС, вероятно, необходимо присутствие в среде специфичных индукторов, природа которых пока не известна.

## **2.5. Сравнительный анализ метрических параметров и матричных свойств ДНК клеток *M. hominis* PG37, образующихся в различных условиях среды**

Метрические параметры ДНК клеток микоплазмы, образующихся в РУС, существенно различаются. Длительное культивирование в НУС (СДС) вызывает уменьшение показателей «ширины» ( $p < 0,05$ ) и «высоты» ( $p < 0,01$ ) молекулы ДНК *M. hominis* PG37 (табл. 1).

Данные АСМ-измерений метрических параметров ДНК (нм) клеток контрольной и опытной культур *M. hominis* PG37

Метрические параметры ДНК* (нм)	Контрольная культура	Опытная культура
Ширина	2,17±0,347	1,92±0,224
Высота	0,391±0,093	0,177±0,059

\*Измерения параметров ДНК в выбранной области проводили в 20 повторностях.

Предполагается, что подобный эффект может быть вызван низкомолекулярными соединениями, ассоциированными с ДНК и/или ДНК-связанными белками [Ткаченко и др., 1998; Давыдова и др., 2005; Lyubchenko, Shlyakhtenko, 2009; Chiancone, Ceci, 2010]. В случае длительного пребывания бактерий в НУС устойчивые к фенольной экстракции, но чувствительные к обработке протеиназой К ДНК-связанные белки клеток микроорганизмов могут вызывать эффект обратимой аттенуации ПЦР-сигнала при использовании матричной ДНК без специальной очистки [Зигангирова и др., 1995]. Различия в спектрах ПЦР-продуктов при амплификации нуклеотидных последовательностей бактериальных клеток, образующихся в РУС, могут приводить к ложным результатам детекции микроорганизмов в тестируемых образцах [Чернов и др., 2009; Chernov *et al.*, 2007].

В результате сравнительного анализа продуктов амплификации генов *dnaK*, *gyrA*, *gyrB*, *parE*, *parC*, *tuf*, *arcA*, *rrlA*, *rrlB*, а также *vaa* изменения ПЦР-сигналов в отношении соответствующих нуклеотидных последовательностей клеток *M. hominis* PG37, образующихся в оптимальных и стрессовых (СДС) условиях, не были обнаружены (рис. 5).

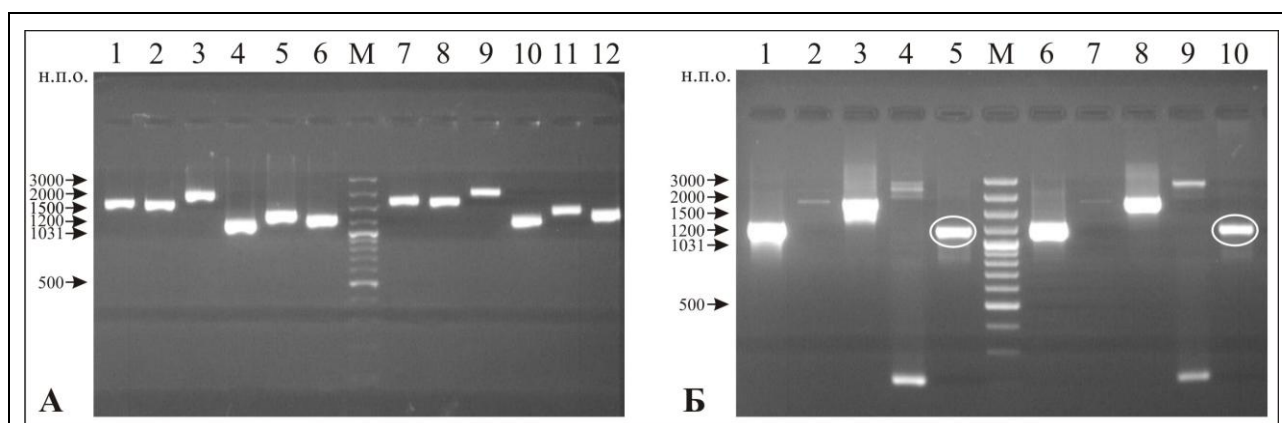


Рис. 5. Электрофореграммы продуктов амплификации нуклеотидных последовательностей генов *M. hominis* PG37:

А – *dnaK* (1, 7), *gyrA1* (2, 8), *gyrB* (3, 9), *tuf* (4, 10), *rrlA* (5, 11), *rrlB* (6, 12) при использовании ДНК клеток *M. hominis* PG37 опытной (СДС) культуры, не обработанной (1-6) и обработанной (7-12) протеиназой К.

Б – *arcA* (1, 6), *gyrA2* (2, 7), *parE* (3, 8), *parC* (4, 9), *vaa* (5, 10) при использовании ДНК клеток *M. hominis* PG37 опытной (СДС) культуры, не обработанной (1-5) и обработанной (6-10) протеиназой К. М – маркер длины фрагментов.

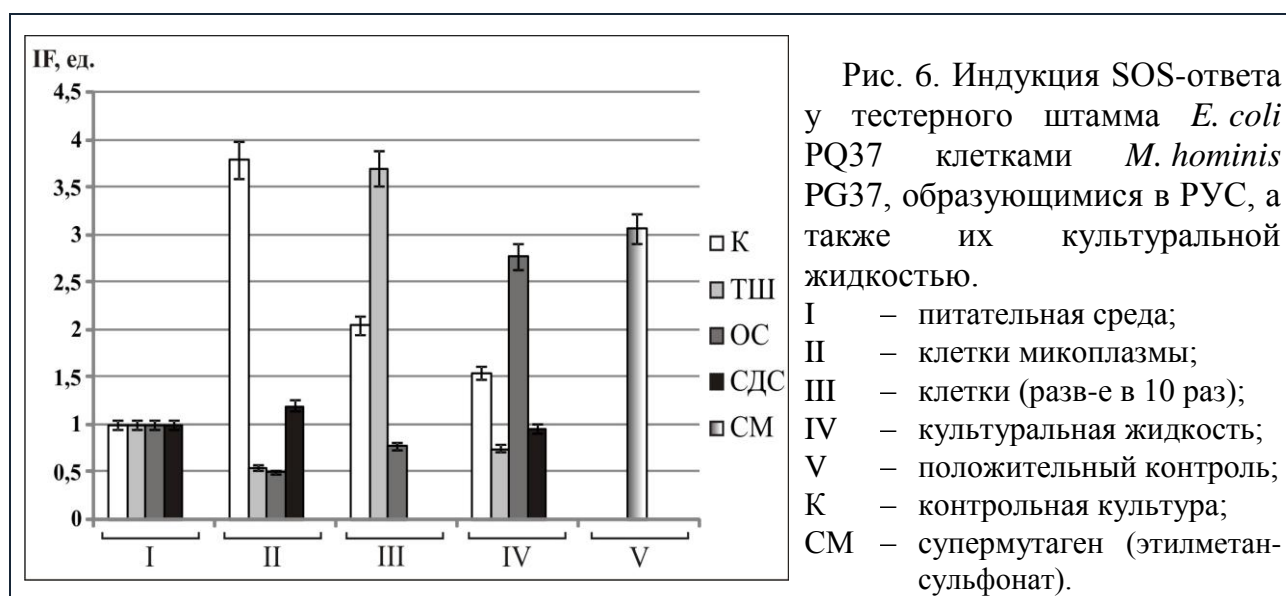
Особенности структурной организации *va*a-гена определяют возможность обнаружения клеток разных штаммов *M. hominis* с помощью направленной амплификации соответствующих нуклеотидных последовательностей [гл. 2.3], поэтому праймеры для амплификации гена *Vaa* могут быть *эффективным диагностическим зондом* для выявления экспресс-методом ПЦР клеток разных штаммов *M. hominis*, в том числе бактерии в НС (рис. 5).

## 2.6. Сравнительный анализ токсигенности *M. hominis* PG37 при культивировании микоплазмы в различных условиях среды

В результате наших исследований было установлено, что *M. hominis* PG37 обладает способностью оказывать ДНК-повреждающее действие на клетки тестерного штамма *E. coli* PQ37. Однако проявление генотоксичности микоплазмы в стрессовых условиях имеет особенности (рис. 6).

Клетки контрольной культуры *M. hominis* PG37 (но не их культуральная жидкость) индуцируют SOS-ответ у тестерного штамма *E. coli* PQ37. ТШ индуцирует появление у клеток *M. hominis* PG37 токсических свойств; проявление генотоксического эффекта наблюдается только при 10-кратном разведении начальной концентрации клеток. В случае ОС генотоксичность у клеток микоплазмы не выявляется, но регистрируется у их культуральной жидкости. При длительном культивировании в условиях СДС клетки микоплазмы и их культуральная жидкость генотоксических свойств не проявляют.

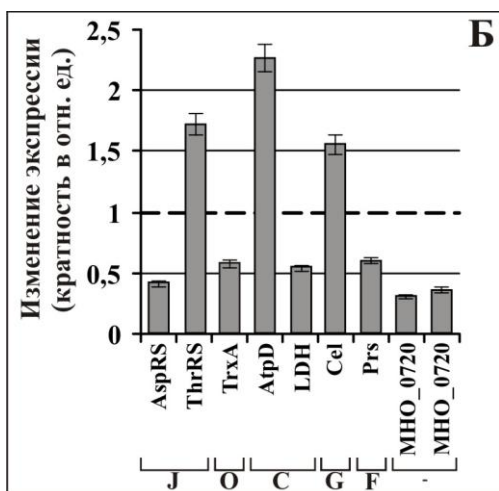
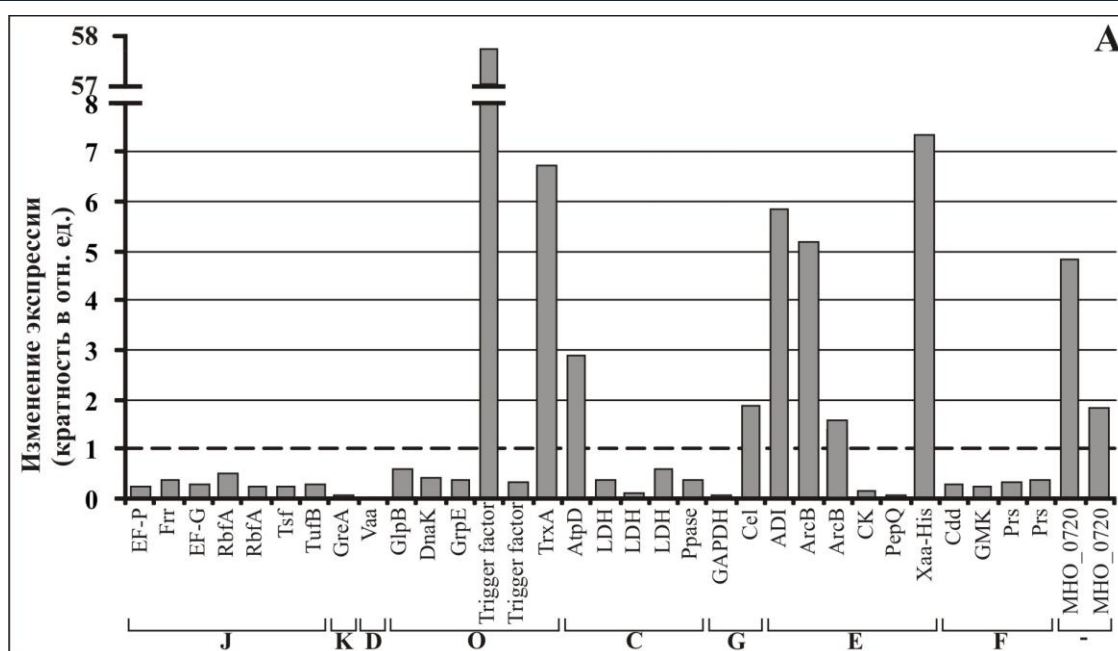
Наличие генотоксических эффектов у культуральной среды клеток *M. hominis* PG37, подвергнутых ОС, позволяет предположить секрецию генотоксических метаболитов из клеток микоплазмы в окружающую среду и/или изменения компонентов культуральной среды под действием секретируемых метаболитов клеток бактерии.



## 2.7. Сравнительный протеомный анализ клеток *M. hominis* PG37, образующихся в различных условиях среды

В результате сравнительного протеомного анализа клеток *M. hominis* PG37, образующихся в различных условиях среды (контроль, ТШ и СДС), нами были выявлены и идентифицированы 9 дифференциально экспрессированных белков в случае ТШ и 53 – в случае СДС (рис. 7А, Б, табл. 2).

Наиболее существенные изменения уровня экспрессии белков наблюдались в случае длительного культивирования в стрессовых условиях (СДС). Для большинства стресс-реактивных белков (36 из 53; 67,92%) при этом было обнаружено понижение уровня экспрессии (24; 45,28%) вплоть до нерегистрируемости сигнала (12; 22,64%); у 10 белков (18,87%) регистрировалось повышение уровня экспрессии, а экспрессия 7 белков (13,21%), наблюдаемая в опыте, отсутствовала в контроле.



Распределение белков по функциональным категориям (COG):

**J** – трансляция; **K** – транскрипция; **D** – контроль клеточного цикла; **O** – посттрансляционная модификация, обмен белков, шапероны; **C** – энергообразование; **G** – транспорт и метаболизм углеводов; **E** – транспорт и метаболизм аминокислот; **F** – транспорт и метаболизм нуклеотидов; «-» – не классифицированы.

Рис. 7. Количественные изменения экспрессии растворимой фракции белков *M. hominis* PG37 в стрессовых условиях – СДС (А) и ТШ (Б).

Идентифицированные белки *M. hominis* PG37, экспрессия которых была выявлена при культивировании микоплазмы только в определенных условиях среды

№	Функциональная категория (NCBI) <sup>1</sup>	Название белка	№ NCBI	Score <sup>2</sup>	% перекрытия	Mг (Да)/pI <sup>3</sup>	Дифференциальность экспрессии <sup>4</sup>	
							ГШ	СДС
1	J	Аспартил-тРНК-синтетаза (AspRS)	gi 269114962	164	27	65700/6,42	2,45	<b>К</b>
2	J	Фактор элонгации G (EF-G)*	gi 269114921	131	22	77934/5,38	–	<b>О</b>
3	J	Треонил-тРНК-синтетаза (ThrRS)	gi 269114879	262	39	68215/7,25	<b>1,72</b>	<b>К</b>
4	J	Фактор элонгации Tu (TufB)*	gi 269114826	169	36	43569/5,75	–	<b>О</b>
5	J	Фактор элонгации Tu (TufB)*	gi 269114826	236	55	43569/5,75	–	<b>О</b>
6	K	Фактор антитерминации транскрипции (NusG)	gi 269115174	184	56	22578/6,02	н.и.	<b>К</b>
7	D	Белок клеточного деления (FtsZ)	gi 18542434	191		40740/4,73	н.и.	<b>К</b>
8	O	Белок теплового шока (DnaK)*	gi 13431502	147	25	80998/5,82	–	<b>О</b>
9	C	Ацетаткиназа (ACK)	gi 269115159	254	54	45101/6,39	н.и.	<b>К</b>
10	G	Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH)*	gi 6523351	167	63	29019/5,35	н.и.	<b>К</b>
11	E	Аминопептидаза C (PepC)	gi 269114809	109	30	51544/5,41	–	<b>О</b>
12	E	ХАА-Pro дипептидаза (PepQ)*	gi 269114986	141	36	39209/5,27	–	<b>О</b>
13	F	Дезоксирибозофосфатальдолаза (DeoC)	gi 269115108	212	62	24252/6,75	н.и.	<b>К</b>
14	F	Уридилаткиназа (UMPК)	gi 269115235	193	56	27046/5,87	н.и.	<b>К</b>
15	P	АТФ-связывающий белок импорта кобальта (CbiO1)	gi 269114971	201	43	29765/5,83	н.и.	<b>К</b>
16	R	Консервативный гипотетический белок (MHO_3310)	gi 269115106	160	31	36031/6,05	н.и.	<b>К</b>
17	S	Гипотетический белок (MHO_0960)	gi 269114870	81	47	11360/4,58	–	<b>О</b>
18	-	Гипотетический белок (hp)*	gi 20152569	100	40	34998/5,55	н.и.	<b>К</b>
19	-	Гипотетический белок (hp)*	gi 20152569	201	54	34998/5,55	н.и.	<b>К</b>

Примечание: <sup>1</sup>P – транспорт и метаболизм неорганических ионов; R – предсказана только общая функция; S – функция не известна, остальные те же, что и для рис. 7. <sup>2</sup>Достоверность поиска белков (score) в базе данных NCBI с использованием программы Mascot [http://www.matrixscience.com], где предел отсечения составлял 83 ( $p < 0,05$ ). <sup>3</sup>Теоретическая молекулярная масса белка в кДа и pI согласно базе данных. <sup>4</sup>Цифры (жирный или обычный шрифт) обозначают кратность изменения экспрессии белка (увеличение или уменьшение соответственно); **К** – обнаруживается в контроле, но отсутствует в опыте; **О** – обнаруживается в опыте, но отсутствует в контроле; «н.и.» – нет изменений в экспрессии между контролем и опытом; «←» – белок не обнаружен ни в контроле, ни в опыте. \*Изоформы белков.

Выявленные различия экспрессии белков у клеток контрольной и опытных культур *M. hominis* PG37 могут быть связаны с особенностями их синтеза, протеолиза, а также распределения их в субклеточных структурах бактерии и секреции в различных условиях среды [Berrier *et al.*, 2000; Wilkins *et al.*, 2003; Muela *et al.*, 2008; Kühner *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009].

44 из 53 идентифицированных нами белков, дифференциально экспрессированных у *M. hominis* PG37, оказались специфичными стресс-реактивными белками микоплазмы для условий СДС, а 9 (AspRS, ThrRS, TrxA, AtpD, LDH, Cel, Prs и 2 изоформы консервативного гипотетического белка (MHO\_0720)) – общими стресс-реактивными белками *M. hominis* PG37, модуляция уровня экспрессии которых была установлена как при ТШ, так и СДС. Однако сходный характер модуляции был выявлен только для 4-х белков (AtpD, LDH, Cel и Prs).

Особенный интерес из 4 общих стресс-реактивных белков представляет Cel (целлюлаза), увеличение уровня экспрессии которой было зарегистрировано как при ТШ, так и СДС. В урогенитальном тракте человека присутствуют бактерии, тоже обладающие соответствующей ферментативной активностью [Garland *et al.*, 1987]. Показано, что повышение в среде ферментативной активности целлюлазы может обуславливать увеличение количества лактобацилл – основного фактора эубиоза генитального тракта, обеспечивающего его защитные функции. Наблюдаемое нами повышение экспрессии соответствующего фермента у *M. hominis* PG37 в стрессовых условиях – при ТШ и СДС, вероятно, связано с наличием в микробиоценозах общих сигнальных систем, обеспечивающих адаптацию бактерий и соответствующих микроэкосистем к НУС.

Выявленные нами стресс-реактивные белки *M. hominis* PG37 и их гены могут быть мишенями для определения механизмов адаптации микоплазмы к РУС и способов контроля микоплазменной инфекции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большой объем экспериментальных и теоретических данных, полученных в последнее время в разных лабораториях мира, существенно расширил представления о биологии и патогенности *M. hominis* – микоплазмы, инфицирующей человека и являющейся контаминантом клеточных культур. Однако факторы, определяющие преодоление защитных систем организма человека и выживание в НУС этой микоплазмы, размер генома которой (665 445 н.п.о) приближается к рекордно малому среди геномов, известных для бактерий (580 076 н.п.о. у *M. genitalium*), способных к самостоятельному воспроизведению, пока не ясны. Исследования адаптации этой микоплазмы к стрессорам немногочисленны и до недавнего времени были в основном связаны с определением молекулярных основ реорганизации поверхностных липопротеинов микоплазмы, определяющих адгезию и ускользание бактерий от иммунного контроля. Определение в 2009 году полной нуклеотидной последовательности генома *M. hominis* PG21 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]

обеспечило принципиально новые возможности для исследования молекулярно-генетических механизмов выживания микоплазмы в стрессовых условиях.

В нашей работе впервые в результате комплексных исследований факторов, определяющих персистенцию *M. hominis*, были выявлены молекулярно-генетические маркеры восприимчивости и устойчивости к персистенции микоплазмы; представлены варианты у клинических изолятов *M. hominis* гена, кодирующего иммунодоминантный белок – цитоадгезин *Vaa*, и показано, что для нуклеотидных последовательностей *vaa*-гена, кодирующих иммунозначимую зону белка, характерна гипервариабельность. Гипервариабельность соответствующего участка *vaa*-гена, может определять специфичную ассоциацию инфекционного агента и хозяина, способствующую персистенции бактерии.

Полученные нами результаты подтверждают предположения, что встречаемость *M. hominis* у пациентов с репродуктивной патологией, а также ассоциация генотипов полиморфных локусов генов цитокинов IL-1 (*IL-1B-511C>T*, *IL-1B+3954C>T*, *IL-1RN(VNTR)*) и IL-10 (*IL-10-1082G>A*) с персистенцией микоплазмы в разных регионах различаются. Эти данные определяют необходимость дифференцированного подхода при разработке схем лечения и профилактики микоплазменной инфекции.

В нашей работе также впервые представлены данные о морфологических, ультраструктурных, токсигенных и молекулярно-генетических особенностях изменений клеток *M. hominis* PG37 в РУС и идентифицированы стресс-реактивные белки микоплазмы.

Результаты наших исследований свидетельствуют, что воздействия стрессоров индуцируют специфичную реорганизацию клеточной и молекулярной биологии микоплазмы. Наличие у *M. hominis* PG37 механизмов для смены программ жизни в РУС определяет необходимость поиска новых подходов для исследования взаимодействия этой микоплазмы с организмом хозяина и способов контроля микоплазменной инфекции. Выявленные нами стресс-реактивные белки *M. hominis* PG37 и их гены могут быть мишенями для определения механизмов адаптации микоплазмы к РУС и способов контроля микоплазменной инфекции. Вместе с тем, очевидно, что разработка эффективных способов подавления микоплазменной инфекции у человека потребует реализации крупномасштабных исследовательских проектов по субпротеомному анализу *M. hominis*, ассоциированному с мембраной и УМФ бактерии, а также транскриптомно-протеомному профилированию клеток микоплазмы и человека при их взаимодействии.

## ВЫВОДЫ

1. Слизистые оболочки урогенитального тракта 30,95% пациентов с отягощенным акушерским анамнезом инфицированы *M. hominis*. У 14,53% инфицированных микоплазмой присутствуют коинфекции – *U. urealyticum* (76,47%), *C. trachomatis* (5,88%), *T. vaginalis* (17,65%).

2. Восприимчивость к *M. hominis* связана с наличием у индивидов определенных вариантов полиморфных локусов генов ключевых иммуномедиаторов

про- и противовоспалительных реакций – IL-1 и IL-10. У носителей аллели *IL-1B+3954\*C*, а также генотипов *IL-1B+3954\*C/\*C* и *IL-10-1082\*G/\*G* повышен риск персистенции *M. hominis*, а у носителей генотипов *IL-1B-511\*T/\*T / IL-1RN\*1/\*1* и *IL-1B+3954\*C/\*T / IL-1RN\*1/\*2* вероятность микоплазменной инфекции снижена.

3. Клинические изоляты *M. hominis* варьируемы по первичной структуре и модульной организации гена, кодирующего цитоадгезин Vaa – фактор вирулентности микоплазмы. Нуклеотидная последовательность *vaa*-гена содержит гипервариабельный участок, ассоциированный с иммунозначимой зоной белка.

4. В культуре *M. hominis* PG37, помимо «типичных» клеток микоплазмы, присутствуют ультрамикрoформы – сферические, окруженные мембраной наноструктуры (диаметр < 0,2 мкм). Длительное пребывание *M. hominis* PG37 в стрессовых условиях приводит к увеличению количества ультрамикрoформ и переходу бактерии в некультивируемое состояние.

5. Длительное пребывание клеток *M. hominis* PG37 в стрессовых условиях приводит к изменению метрических показателей ДНК микоплазмы, но не вызывает изменения матричных свойств молекулы в отношении амплификации генов *dnaK*, *gyrA*, *gyrB*, *parE*, *parC*, *tuf*, *arcA*, *rrlA*, *rrlB*, а также *vaa*. Праймеры для амплификации *vaa*-гена могут быть эффективным диагностическим зондом для обнаружения экспресс-методом ПЦР клеток разных штаммов *M. hominis*, в том числе бактерии в некультивируемом состоянии.

6. *M. hominis* PG37 обладает генотоксичностью, проявление которой в стрессовых условиях имеет особенности. Образующиеся при оптимальных условиях клетки *M. hominis* PG37 (но не их культуральная жидкость) индуцируют SOS-ответ у тестерного штамма *Escherichia coli* PQ37; ТШ обуславливает появление у клеток также токсических свойств, а ОС – подавление генотоксичности у клеток микоплазмы и проявление ДНК-повреждающего действия у их культуральной жидкости. Культура клеток микоплазмы в некультивируемом состоянии генотоксических свойств не проявляет.

7. Различные виды стрессоров индуцируют у *M. hominis* PG37 изменение экспрессии как специфических, так общих белков. 44 из 53 идентифицированных стресс-реактивных белков *M. hominis* PG37 являются специфическими для СДС, а 9 белков (*AspRS*, *ThrRS*, *TrxA*, *AtpD*, *LDH*, *Cel*, *Prs* и 2 изоформы консервативного гипотетического белка (МНО\_0720)) проявляют изменение экспрессии в условиях ТШ и СДС. Идентифицированные стресс-реактивные белки участвуют в процессах трансляции, транскрипции, посттрансляционной модификации, регуляции клеточного цикла, энергообразовании, транспорте и метаболизме углеводов, аминокислот, нуклеотидов, неорганических ионов, а также вирулентности.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Горшков, О.В. Генетический полиморфизм микоплазм: варибельности генов цитоадгезинов у клинических изолятов *Mycoplasma hominis* / О.В. Горшков, В.М. Чернов, О.А. Чернова, **Н.Б. Баранова** и др. // ДАН. – 2005. – Т. 404, N 2. – С. 1-4.
2. Chernov, V.M. Variability of the *vaa* cytoadhesin genes in clinical isolates of *Mycoplasma hominis* / V.M. Chernov, O.V. Gorshkov, O.A. Chernova, **N.B. Baranova et al.** // NEW Microbiol. – 2005. – Vol. 28. – P. 373-376.
3. Чернова, О.А. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов IL-1B, IL-1RN и IL-10 у человека при персистенции микоплазм (*Mycoplasma hominis*) / О.А. Чернова, **Н.Б. Баранова**, Н.И. Акберова и др. // Цитокины и воспаление. – 2008. – Т. 7, N 4. – С. 11-14.
4. Chernov, V.M. Genotoxic effects of mycoplasma cells (*A. laidlawii* PG8, *M. gallisepticum* S6, *M. hominis* PG37) formed in different growth conditions / V.M. Chernov, O.A. Chernova, A.B. Margulis, A.A. Mouzykantov, **N.B. Baranova et al.** // Am. Eurasian J. Agric. Environ Sci. – 2009. – Vol. 6, N 1. – P. 104-107.
5. Trushin, M.V. Atomic force microscopy analysis of DNA extracted from the vegetative cells and the viable, but nonculturable, cells of two mycoplasmas (*Acholeplasma laidlawii* PG8 and *Mycoplasma hominis* PG37) / M.V. Trushin, V.M. Chernov, O.V. Gorshkov, **N.B. Baranova**, O.A. Chernova // Scientific World JOURNAL. – 2010. – Vol. 10. – P. 894-900.
6. Горшков, О.В. Полиморфизм *Mycoplasma hominis*: особенности структуры и варибельности генов цитоадгезинов *Vaa* клинических изолятов / О.В. Горшков, О.А. Чернова, **Н.Б. Баранова** и др. // «Медицинская микробиология – XXI век» Всероссийская научно-практическая конференция / Под ред. В.В. Кутыревам. – Саратов, 2004. – С. 68-69.
7. **Баранова, Н.Б.** Полиморфизм генов семейства *IL-1* при персистенции микоплазм у человека / Н.Б. Баранова, А.А. Музыкантов, О.В. Горшков // «Биология – наука XXI века» 10-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых, посвященная 50-летию Пущинского научного центра РАН. Сб. тез. – Пущино: Изд-во Пущинского научного центра, 2006. – С. 66.
8. **Баранова, Н.Б.** Персистенция микоплазм у человека: полиморфизм генов адгезии (*vaa*) *Mycoplasma hominis* и цитокинов (*IL-1*, *IL-10*) у носителей микоплазмы / Н.Б. Баранова, А.А. Музыкантов, Г.Ф. Шаймарданова, О.В. Горшков // «Молодые ученые в медицине» XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 150-летию со дня рождения В.М. Бехтерева: Тез. докл. – Казань: Отечество, 2007. – С. 275-276.
9. **Баранова, Н.Б.** Молекулярные основы персистенции микоплазм у человека: гены *vaa* у клинических изолятов *Mycoplasma hominis* и IL (1, 10) у носителей микоплазмы / Н.Б. Баранова, А.А. Музыкантов, Г.Ф. Шаймарданова, О.В. Горшков // «Фундаментальные аспекты исследования симбиотических систем», Всероссийская

конференция с международным участием: Тез. докл. – Саратов, 2007. – С. 35.

10. **Баранова, Н.Б.** Особенности вариабельности генов *vaa* у клинических изолятов *Mycoplasma hominis* и *IL* (1, 10) у носителей микоплазмы / Н.Б. Баранова, А.А. Музыкантов, Г.Ф. Шаймарданова, О.В. Горшков // «Биология – наука XXI века» 11-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Сб. тез. – Пущино: Изд-во Пущинского научного центра, 2007. – С. 69-70.

11. Чернов, В.М. Адаптация микоплазм к неблагоприятным условиям роста связана с превращением вегетативных форм клеток в наноформы / В.М. Чернов, О.А. Чернова, О.В. Горшков, Г.Ф. Шаймарданова, А.А. Музыкантов, **Н.Б. Баранова** и др. // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Сб. тез. – Новосибирск: Арта, 2008. – С. 144.

12. Пельникевич, А.Д. Изменение вирулентных свойств микоплазм при адаптации к стрессорам / А.Д. Пельникевич, А.А. Музыкантов, **Н.Б. Баранова** и др. // «Постгеномная эра в биологии и проблемы в биотехнологии» II Международная научно-практическая конференция. Сб. тез. – Казань, 2008. – С. 102-103.

13. **Baranova, N.B.** Molecular-genetic factors for persistence of mycoplasmas (*M. hominis*) in humans / N.B. Baranova, O.V. Gorshkov, G.F. Shaymardanova et al. // Abstracts of 14<sup>th</sup> International conference «Microbial enzymes in biotechnology and medicine». – Kazan, 2009. – P. 96-97.

14. Gorshkov, O.V. *Mycoplasma hominis* strain 28 variable adherence associated protein (*vaa*) gene, partial cds. ACCESSION GU056039 / O.V. Gorshkov, **N.B. Baranova**, O.A. Chernova, V.M. Chernov // Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/GU056039.1>, свободный. – Проверено 20.09.2010.

15. **Баранова, Н.Б.** Ответные реакции *Mycoplasma hominis* PG37 на стрессоры: морфология, ультраструктура и экспрессия белков клеток микоплазм / Н.Б. Баранова, М.В. Трушин // «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» Российская школа молодых ученых. Тез. докл. – Казань: Изд-во КФУ, 2010. – С. 13.

### Список сокращений и условных обозначений

ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ	–	колониеобразующие единицы
мкм	–	микрометр
н.п.о	–	нуклеотидные пары оснований
нм	–	нанометр
НС	–	некультивируемое состояние
НУС	–	неблагоприятные условия среды
ОАА	–	отягощенный акушерский анамнез
ОС	–	окислительный стресс
ППСЭ	–	полноценная питательная среда Эдварда
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РУС	–	различные условия среды
СДС	–	совокупное действие стрессоров
ТШ	–	тепловой шок
УМФ	–	ультрамикроформы
<i>IL-1B-511C&gt;T</i>	–	полиморфизм гена <i>IL-1B</i> , обусловленный однонуклеотидными заменами в положении -511 и +3954 соответственно
<i>IL-1B+3954C&gt;T</i>		
<i>IL-10-1082G&gt;A</i>	–	полиморфизм гена <i>IL-10</i> , обусловленный однонуклеотидными заменами в положении -1082
<i>IL-1RN(VNTR)</i>	–	полиморфизм гена <i>IL-1RN</i> , обусловленный изменениями числа копий повторяющихся последовательностей
Vaa	–	вариабельный антиген, участвующий в адгезии ( <u>v</u> ariable <u>a</u> dherence- <u>a</u> ssociated antigen)

Отзывы на автореферат просьба отправлять по адресу 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18, ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», отдел аттестации научно-педагогических кадров, ученому секретарю З.И. Абрамовой.