

ные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (ИКИ), качественные признаки — в виде относительной частоты и 95% доверительного интервала (ДИ).

Результаты наших исследований показали, что у больных с острым (45 человек) и хроническим (108 человека) гайморитами хламидийная инфекция была выявлена соответственно у 16 (36 %, 95% ДИ 22 — 50 %) и у 28 человек (26,6 %; 95% ДИ 17,7 — 34,2).

При сравнении гематологических и иммунологических показателей у больных с острым гайморитом независимо от наличия или отсутствия хламидийной инфекции статистически значимых различий получено не было.

При сравнении с контролем в обеих группах больных были обнаружены однонаправленные изменения лабораторных показателей. Так, у лиц с острым синуситом наблюдались лейкоцитоз ($p = 0,002$), относительные эозинофилия ($p < 0,001$) и лимфопения ($p = 0,01$). У больных с неподтвержденной хламидийной инфекцией имело место снижение абсолютной концентрации CD3⁺T-лимфоцитов ($p = 0,04$) и повышение относительных и абсолютных показателей CD72⁺ В-лимфоцитов ($p = 0,01$).

При сравнении больных с хроническим гайморитом, ассоциированным и неассоциированным с хламидийной инфекцией, было выявлено значительно больше различий. У больных с наличием хламидий имело место снижение относительных показателей CD3⁺T-лимфоцитов и CD4⁺T-лимфоцитов ($p < 0,001$) и повышение относительной величины CD16⁺-лимфоцитов ($p = 0,01$), а так же фагоцитарного числа ($p = 0,05$) и индекса ($p = 0,01$). Концентрация отдельных классов иммуноглобулинов в обеих группах также статистически значимо различались между собой. Так, у лиц с идентифицированной хламидийной инфекцией концентрация IgA была значительно ниже, чем у больных с отрицательными результатами анализов на хламидийный возбудитель (соответственно Me₁ = 200 МЕ/мл, Me₂ = 230 МЕ/мл, $p = 0,05$). Содержание IgM также было ниже у больных с хламидийной инфекцией (соответственно Me₁ = 180 МЕ/мл, Me₂ = 255 МЕ/мл, $p = 0,007$).

По сравнению со здоровыми лицами в обеих группах наблюдались лейкоцитоз ($p < 0,001$), эозинофилия ($p < 0,001$), снижение относительной доли лимфоцитов ($p = 0,02$), повышение относительных и абсолютных показателей CD72⁺T-лимфоцитов ($p = 0,01$).

Только при сравнении здоровых лиц с группой больных с идентифицированной хламидийной инфекцией отмечалось повышение относительного содержания сегменто-ядерных лимфоцитов ($p = 0,02$), CD3⁺T-лимфоцитов ($p = 0,02$), CD4⁺T-лимфоцитов ($p = 0,002$) и CD16⁺T-лимфоцитов ($p = 0,05$).

Таким образом, у больных с воспалительными заболеваниями гайморовых пазух хламидийная инфекция была выявлена у трети лиц. При острых воспалительных процессах в верхнечелюстных пазухах иммунный ответ на вне- и внутриклеточные микробные агенты был идентичен. У инфицированных и неинфицированных хламидиями больных хроническим гайморитом, несмотря на наличие ряда однотипных реакций иммунной системы, при хламидийном заражении наблюдается более выраженное угнетение клеточного и гуморального звеньев иммунитета.

Е.В. Персиянова¹, К.В. Киселев², Г.К. Чернодед²

ВОЗДЕЙСТВИЕ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* И ИХ ТОКСИНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *PG-PAL* И *PG-GLU1* В КАЛЛУСАХ ЖЕНЬШЕНЯ НАСТОЯЩЕГО *PANAX GINSENG C.A. MEY*

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (Владивосток)

² Биолого-почвенный институт ДВО РАН (Владивосток)

Существенную роль в экологии бактерий псевдотуберкулеза — возбудителя сапронозов, и в эпидемиологии вызываемой ими инфекции играют растения. Микроорганизмы часто обнаруживаются на растительных субстратах, они размножаются на овощах и корнеплодах, а также в овощных соках, салатах при пониженной температуре (Сомов Г.П., 1979; Кузнецов В.Г., 1997). К настоящему времени имеются сведения о том, что между бактериями псевдотуберкулеза и растительными клетками развиваются сложные взаимоотношения (Тимченко Н.Ф. и соавт., 2004). С одной стороны, микроорганизмы реализуют патогенный потенциал (инвазивный и токсический), с другой — выявлено стимулирующее и ингибирующее воздействие растительных клеток на рост иерсиний. Однако сведений о взаимоотношениях между иерсиниями и растениями на молекулярном уровне мы не обнаружили.

Чтобы узнать ответную реакцию клеток растений на воздействие бактерий псевдотуберкулеза и их токсинов нами была изучена экспрессия защитных генов на примере клеток женьшеня, потому что из существующих растений в группе биоинженерии БПИ ДВО РАН защитные гены данного вида лучше всего изучены. Для подтверждения активации защитных реакций растений чаще всего исследуют экспрессию защитных белков: PR («pathogen-related») белков (Leubner-Metzger and Meins, 1999). На-

пример, фенилаланинаммиаклиаза (*PAL*) — один из основных ферментов, участвующий в синтезе фитоалексинов, защитных метаболитов растений, или глюканаза (*GLU*), фермент, участвующий в расщеплении полисахаридов, основных компонентов внешних покровов грибов и насекомых — массовых вредителей растений. Экспрессия данных ферментов многократно возрастает при активации защитных реакций и поэтому, нами были выбраны именно они. Ввиду этого, целью работы явилось изучение действия *Y.pseudotuberculosis* и их токсинов на экспрессию генов *PG-PAL* и *PG-GLU1* в каллусах женьшеня *Panax ginseng* С.А.Мей.

На каллусы женьшеня в конце пассажа (на 30 день) наносили по 20 мкл термолабильного и термостабильного летальных токсинов и бактерий в концентрациях 60 мкг/мл, 2,5 мг/мл, 10⁵ бактерий/мл соответственно. В качестве контроля наносили стерильный 0,85% раствор NaCl. Токсины выделяли из бактерий псевдотуберкулеза (штаммы 512 I серовар и 2517 III серовар) согласно методам (Тимченко Н.Ф. и соавт., 2004). Каллусы инкубировали в течение трех суток при температуре 23-25⁰С. Для анализа дифференциальной экспрессии генов *PAL* и *GLU* в каллусах женьшеня линии GV под влиянием патогенных агентов на 1 и 3 сут эксперимента из растительных клеток выделяли тотальную РНК с помощью набора Yellow Solve (Силекс, Россия). Комплементарную ДНК (кДНК) получали, используя 1–3 мкг тотальной РНК, с помощью набора для обратной транскрипции с М-MLV ревертазой по рекомендациям производителя (Силекс, Россия). Реакцию обратной транскрипции проводили при 37 °С в течение 1–2 часов. Затем образцы кДНК (0,2–2 мкл) амплифицировали с использованием праймеров к гену актлина женьшеня и дегенеративных праймеров к генам *PAL* и *GLU*. ПЦР проводили согласно методу (Kiselev et al., 2006; Bulgakov et al., in press). Интенсивность полученных сигналов обсчитывали в программном обеспечении геле документировющей системы (GEL DOC BIORAD, США). Обсчет и нормализацию по актину проводили по методу (Kiselev et al., 2006).

Важно отметить, что гены *PAL* растений — это мультигенное семейство, состоящее из около 30–40 генов (Cramer et al., 1989). Еще нет полного понимания в регуляции и функционирования генов *PAL* для основных модельных объектов, которые используются в молекулярной биологии растений. Например, для арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* все гены *PAL* формируют 4 подсемейства, они отличаются по своим биохимическим свойствам, предполагается, что они участвуют в разных метаболических реакциях, иногда беря на себя функции первичного метаболизма, что не связано с защитными реакциями (Cochrane et al., 2004). Ранее не было данных о формах *PAL* женьшеня, поэтому на основе известных генов *PAL* растений нами сконструированы дегенеративные праймеры, которые работали бы со всеми возможными генами *PAL* женьшеня. Результаты секвенирования ПЦР продуктов, полученных с кДНК женьшеня, показали наличие около 30 генов *PAL* женьшеня, все они по аминокислотной последовательности формировали 3 подсемейства. Мы назвали их в порядке секвенирования: P_g-PAL1, P_g-PAL2, P_g-PAL3. Генов глюканаз меньше по числу существующих форм, но они также могут существовать в нескольких формах в геноме растений. Поэтому нами сделаны дегенеративные праймеры по известным формам глюканаз растений. Анализ секвенированных ПЦР продуктов с кДНК женьшеня показал, что в культурах женьшеня в основном экспрессируется только одна форма — P_g-Glu1. Доказано, что экспрессия этой формы увеличивается при стрессовых воздействиях, и поэтому ее отнесли к PR белкам (Kiselev et al., 2006).

Исследования показали, что уже в 1 сут. в клетках женьшеня при воздействии *Y. pseudotuberculosis* и термолабильным токсином наблюдалась повышенная экспрессия генов *PAL*. Экспрессия возрастала в 2–4 раза по сравнению с контролем. Повышенная экспрессия генов *PAL* сохранялась и на 3 сут. воздействия иерсиний. Больше всего возрастала экспрессия генов подсемейства P_g-PAL2, что, возможно, говорит о большей ее роли в синтезе защитных фитоалексинов. Также достоверно (в 2–3 раза), по сравнению с контролем, возрастала экспрессия глюканазы P_g-glu1 в 1 сут. эксперимента. Повышенная экспрессия гена P_g-glu1 сохранялась и на 3 сут. воздействия иерсиний.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что растительные клетки узнают патогенное воздействие *Y.pseudotuberculosis* и отвечают активацией своих защитных механизмов.

В.К. Покровский

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ЛЕТАЛЬНОГО ТОКСИНА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (Владивосток)

К настоящему времени есть сведения о нескольких белковых токсинах *Y.pseudotuberculosis*: термолабильном и термостабильном летальных белковых токсинах (ТлТУр, ТсТУр), цитотоксине YopE, суперантигене YPM, факторах, нарушающих проницаемость сосудов кожи — PF-раннем и PF-позднем, ци-