

УДК 579.841.1:579.253.2

## ВПЛИВ ХІМІЧНО-МОДИФІКОВАНОГО ГЛІКОПРОТЕЇДНОГО АНТИГЕНУ СИНЬОГНІЙНОЇ ПАЛИЧКИ НА ПОКАЗНИКИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

Городницька Н. І., Мартинов А. В.

ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України”

Проблема лікування післяопераційних ускладнень, викликаних синьогнійною паличкою, залишається вельми актуальною [1, 2]. Це пов'язано як з чисельною лікарняною стійкістю цього збудника до більшості антибіотиків, так і з особливою мінливістю його антигенів [3]. Вельми актуальним є розробка технології отримання антигенів, які б викликали синтез антитіл в захисному рівні при різних шляхах введення. Подібні дослідження проводяться з початку ХХ сторіччя, але до цього часу не увінчалися успіхом [4, 5]. Найвищі захисні титри антитоксинів, які вдалося індукувати проти синьогнійної палички при використанні різних ад'ювантів, це 1:1024 [6]. В США проходять клінічні випробування двох антисиньогнійних вакцин: на основі поріну F в комплексі з сідерофорним рецептором (білків FpvA та OprF) та на основі генної вакцини, ДНК якої кодує той же OprF [7, 8]. Автори показали консервативний характер структури поріну, його імуногенність, достатньо високу ефективність при вакцинації тварин, а також здатність індукувати синтез антитіл з бактерицидними властивостями по відношенню до більшості штамів синьогнійної палички [8]. При цьому акцентовано увагу на ряді проблем щодо впровадження вакцини у виробництво, а саме: низький рівень білку F в клітинній стінці, неповне виснаження живильного середовища при культивуванні штаму в незбагачених середовищах. Одним із шляхів створення надійної вакцини є хімічна модифікація антигену [9], що дозволяє захистити структуру антигену від дії протеолітичних ферментів при пероральній імунізації та збільшити кількість антигенних епітопів для розпізнавання плазматичними клітинами. Другою проблемою в біотехнології культивування синьогнійної палички на промислових (незбагачених) середовищах є низька концентрація білків, в т.ч. FpvA та OprF, які є основними імуногенними компонентами вакцини [8]. Повне гальмування росту синьогнійної палички при 40% виснаженні середовища не дає можливості в повній мірі використати все середовище для накопичення мікробної маси та робить процес промислового культивування малорентабельним. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є використання в якості компонентів середовища неметаболітичних енхансерів росту в наднизьких концентраціях (від 0,1% до  $10^{-6}$  %), які на незбагачених середовищах значно підвищують рівень їх виснаження, скорочують час накопичення мікробної маси та відповідно підвищують кількість синтезованого клітинами білку без суттєвої зміни морфології клітин та імуногенності антигенів.

Метою нашої роботи було вивчення впливу на показники імуноної системи модифікованого глікопротеїдного антигену синьогнійної палички, який може вико-

ристовуватись для профілактики та лікування синьогнійної інфекції.

### Матеріали і методи

Для отримання синьогнійної вакцини-кандидата використовували штам *P. aeruginosa* ІГН 66-16. Протективний антиген було вилучено з клітинної стінки штаму *P. aeruginosa* ІГН 66-16, який культивували на поживному агарі з додаванням комбінації енхансерів із групи похідних ізохінолінів, імідазолів та піримідинів в концентрації 0,01 % кожного [10].

Зразком дослідження була модель глікопротеїдного антигену синьогнійної палички. Ацилювали тільки поверхневі антигени. Ступінь ацилювання коливалася від 1,0 % до 15,0 % з шагом в 2,0 %. Всього було досліджено 8 зразків модифікованого глікопротеїдного антигену.

Для імунізації мишей використовували зразки антигену з різним ступенем ацилювання: 1,0 %; 3,0 %; 5,0 %; 7,0 %; 9,0 %; 11,0 %; 13,0 %; 15,0 %. На кожний зразок ацилюваного глікопротеїдного антигену використовували по 20 тварин. Тварин поділили на 2 групи (по 80 в кожній). Першій групі мишей вводили 8 зразків глікопротеїдного антигену з різним ступенем ацилювання (по 10 тварин на кожний зразок) підшкіряно по 0,2 мл за стандартною схемою (в 1, 3 та 7 дні); другій групі (по 10 тварин на кожний зразок) – за схемою професора Бабича Є.М. (через день по 0,2 мл перорально протягом 15 днів) [11].

В якості контролю використовували немодифікований глікопротеїдний антиген синьогнійної палички для імунізації мишей.

Рівень антитіл встановлювали реакцією пасивної гемаглютинації. Реакцію гемаглютинації проводили у 96-луноквих круглодонних імунологічних планшетах, куди додавали по 0,02 мл 0,1% суспензії еритроцитів барана, танізованих антигеном *P. aeruginosa*.

Рівень антитіл встановлювали послідовними десятикратними (та двократними) розведеннями сироваток крові мишей, які додавали в кількості 0,02 мл до лунок планшетів. Наявність аглютинатів свідчила про утворення імуних комплексів.

В якості контролю використовували нормальний людський імуноглобулін (титр антисиньогнійних антитіл складав від 0 до (1:10) згідно АНД) та сироватку крові невакцинованих мишей (титр від 0 до 1:10).

Розвиток гіперчутливості уповільненого типу (ГУТ) при введенні модифікованого глікопротеїдного антигену синьогнійної палички для експериментальної вакцинації оцінювали в плантарному тесті [12].

Імуномодулюючу дію глікопротеїдного антигену синьогнійної палички визначали за абсолютною кількістю антитілоутворюючих клітин на селезінку миші та оцінювали по відношенню до еритроцитів барану (ЕБ) [13]. Мишей імунізували однократно по 1,0 мл суміші, яка вміщує рівні об'єми синьогнійного антигену для експериментальної вакцинації в дозах 50 або 100 мкг, а також 2,0 % суспензії еритроцитів барану. Через 4 дні після імунізації в селезінці кожної миші за методом локального гемолізу в гелі (метод Jerne и Nordin) [13] визначали число антитілоутворюючих клітин (АУК). Кількість продуцентів антитіл на лімфоїдний орган підраховували за числом макроскопічно видимих зон гемолізу навколо АУК.

Для оцінки фагоцитарної та ферментативної активності макрофагів використовували клітини перитонеального ексудату мишей [13]. Тварин дослідної групи імунізували розробленим модифікованим глікопротеїдним антигеном синьогнійної палички в дозах 50 та 100 мкг/мл підшкіряно.

Через 7 днів після імунізації визначали фагоцитарний показник – відсоток фагоцитуючих макрофагів із числа нарахованих, фагоцитарне число – середня кількість поглинутих клітин стафілококу на 1 фагоцитуючу клітину та інтенсивність внутрішньоклітинного перетравлення в тесті з нітросинім тетразолієм ( НСТ-тест) [14].

Об'єктом фагоцитозу була добова культура *Staphylococcus aureus*, штам № 209 в кінцевій концентрації  $2,5 \times 10^8$  КУО/мл.

Статистичну обробку проводили методом варіаційної статистики з використанням критерія Ст'юдента та за допомогою комп'ютерної програми «Biostat-4».

### Результати та їх обговорення

Залежність між рівнем індукованих специфічних антитіл та ступенем ацилювання модифікованого глікопротеїдного антигену синьогнійної палички приведена на рис 1.

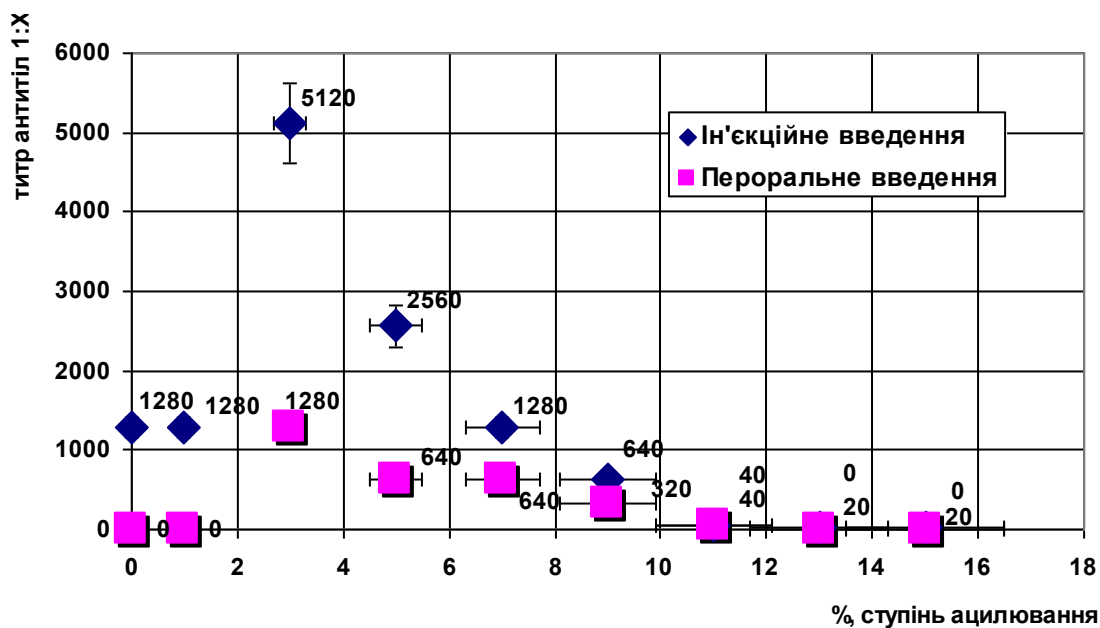


Рис. 1. Залежність імуногенності різних варіантів глікопротеїдного антигену синьогнійної палички від ступеню його ацилювання ( $p < 0,05$ )

Цей варіант антигену-кандидата представляв собою хімічну спліт- вакцину на основі модифікованого глікопротеїдного високомолекулярного антигену з масою 1,5 мДа за методом гель-фільтрації та зарядом молекули 186000 за методом іонообмінної хроматографії (перша фракція). Саме перша фракція, яка виходить з колонки при гель-фільтрації, є найбільш імуногенною [15].

Крім того, поверхневий білок *OrgF* та його рецептор *FrvA*, як найбільш консервативні, дають змогу забезпечити незалежність від серо- та імунотипу синьогнійної палички, а також від характеристик штаму, умов його культивування та токсиноутворення [8]. Останній факт залежить виключно від наявності факторів агресії і виснаження середовища та в деяких випадках є головною перепорою впровадження вакцинних препаратів на основі екзотоксину А [16].

Слід також звернути увагу на той факт, який був виявлений під час ін'єкційної вакцинації мишей: введення немодифікованого антигену на сьомий день викликало у тварин контрольної групи алергічні реакції у вигляді тремору, падіння рухової активності та відмови вживання їжі протягом доби. При цьому, введення всіх модифікованих варіантів глікопротеїдного антигену не викликало побічних явищ у тварин.

Як видно з рис. 1, ацильований варіант глікопротеїдного антигену із ступенем ацилювання 1,0 % викликав індукцію синтезу антитіл на рівні 1:1280 при ін'єкційному застосуванні, аналогічно як і неацильований. Пероральне використання немодифікованого глікопротеїдного антигену та антигену із ступенем ацилювання в 1,0 % не приводило до індукції синтезу специфічних антисиньогнійних антитіл.

Похідне глікопротеїдного антигену із ступенем ацилювання 3,0 % приводило до активації синтезу антитіл на рівні 1:5120 для ін'єкційного варіанту та 1:1280 для перорального варіанту використання. Ацильоване на 5,0 % похідне індуквало синтез специфічних антитіл на рівні 1:640 для пероральної форми застосування та на рівні 1:2560 для ін'єкційної форми, на 7,0 % - 1:640 та 1:1280 відповідно, на 9,0 % - 1:320 та 1:640 відповідно.

Зрівнялися показники антитіл у вакцинованих тварин при пероральному та ін'єкційному застосуванні тільки при використанні антигену зі ступенем ацилювання 11,0 % та дорівнювали 1:40, при ступені ацилювання в 13,0 % імуногенною була тільки ін'єкційна форма антигену – кандидата та індуквала синтез антитіл на рівні 1:20.

При ступені ацилювання 15,0 % спостерігалася індукція синтезу специфічних антитіл на рівні 1:20 при

ін'екційному введенні, при пероральному введенні не спостерігалось синтезу антитіл.

Таким чином, характерною відзнакою глікопротеїдного висомолекулярного антигену синьогнійної палички була індукція синтезу антитіл не тільки у похідного із ступенем ацилювання 3,0 % , а також у похідних із ступенями ацилювання 5,0 %; 7,0 %; 11,0 % при пероральному застосуванні за схемою професора Бабица С. М.

В якості контролю використовували немодифікований антиген, який давав максимальний титр антитіл при ін'екційному введенні 1:1280. Пероральне використання немодифікованого глікопротеїдного антигену не приводило до індукції синтезу антитіл.

В чотири рази більшим був титр антитіл при ін'екційному застосуванні глікопротеїдного антигену із ступенем ацилювання 3,0 % , ніж при його пероральному використанні.

Незважаючи на значно більше антигенне навантаження, ніж при ін'екційному використанні, пероральне використання частково сукцинільованого глікопротеїдного антигену було ефективним та індукувало рівень антитіл, які у перспективі можуть довготривало (рік та більше) захищати тварину від синьогнійної інфекції.

Для оцінки ефективності модифікованого глікопротеїдного антигену синьогнійної палички, який було вилучено з клітинної стінки штаму *P. aeruginosa* 66-16 [17], вивчено його вплив на показники імунної системи.

Досліджено вплив модифікованого глікопротеїдного антигену синьогнійної палички для експериментальної вакцинації на клітинну ланку імунітету за індукцією гіперчутливості уповільненого типу (ГУТ).

Як показали результати досліджень, представлені в табл. 1, високий рівень ГУТ за індексом реакції, був виявлений при введенні глікопротеїдного антигену синьогнійної палички в дозі 100 мкг/мл ( $p < 0,05$ ). Глікопротеїдний антиген синьогнійної палички в дозі 50 мкг/мл викликав рівень ГУТ меншого ступеню при статистично достовірній різниці з контрольною групою ( $p < 0,05$ ). При вивченні імуномодулюючої дії глікопротеїдного антигену синьогнійної палички для експериментальної вакцинації по відношенню до еритроцитів барану було показано, що він в дозах 50 мкг/мл та 100 мкг/мл не чинив впливу на вміст АУК.

**Таблиця 1. Вплив модифікованого глікопротеїдного антигену синьогнійної палички на показники імунної системи**

Препарат	Доза імунізації (мкг)	Фагоцитарна активність		НСТ-тест Кількість деформазан-позитивних клітин, %	Розвиток ГУТ Індекс реакції, %	Імуномодулююча дія Абсолютна кількість АУК на селезінку з довірчим інтервалом
		Фагоцитарний показник, %	Фагоцитарне число			
Синьогнійний антиген	50	30,8±1,4*	1,8 + 0,2*	8,4 ±0,6*	24,5±1,8*	23821 (20940:26702)
	100	38,6±2,1*	2,4 ±0,17*	10,8 ±0,9*	30,4±2,5*	24589 (20882:28295)
Контроль	-	21,4±0,7	1,29 ±0,06	4,8 ±0,8	15,6±1,8	26518 (18739:34797)

**Примітка.** \* - Різниця показників статистично достовірна ( $p < 0,05$ )

Як видно з таблиці 1, модифікований глікопротеїдний антиген синьогнійної палички викликає кількісні та якісні зміни в фагоцитарній системі імунітету. Кількісно глікопротеїдний антиген синьогнійної палички викликає збільшення числа фагоцитуючих клітин, якісно – збільшення здатності фагоцитів поглинати та внутрішньоклітинно перетравлювати мікроорганізми з посиленням реакції відновлення нітросинього тетразолію.

Результати досліджень свідчать про те, що отриманий модифікований глікопротеїдний антиген синьогнійної палички для експериментальної вакцинації є імуногенним, викликає виражену стимуляцію фагоцитарної активності макрофагів, стимулює гіперчутливість уповільненого типу. Антиген не мав імуномодулюючої дії в імунізуючих дозах, рекомендованих для людини (50-100 мкг/мл).

### Висновки

1. В результаті досліджень встановлено, що отриманий модифікований глікопротеїдний антиген синьогнійної палички має виражені імуногенні властивості: викликає індукцію синтезу протисиньогнійних антитіл на достатньому рівні (від 1:1280 для пероральної форми та 1:5120 для ін'екційної).

2. Модифікований глікопротеїдний антиген синьогнійної палички стимулює фагоцитарну активність макрофагів, гіперчутливість уповільненого типу.

3. В результаті досліджень було показано, що модифікований на 3 % глікопротеїдний антиген синьогнійної палички не мав імуномодулюючої дії в дозах 50-100 мкг/мл.

### Перспективи подальших досліджень

Використання пероральної вакцинації є перспективним напрямком удосконалення вакцин, але залишається ряд невирішених питань: що саме змінюється в імунній системі при індукції синтезу таких високих концентрацій специфічних імуноглобулінів. Не вивчена динаміка змін імунної відповіді на пероральний антиген. Не встановлена причина затримки з початком імунної відповіді. На це і будуть направлені наші подальші дослідження.

### Список літератури

- Брискин, Б. С. Внутрибольничная инфекция и послеоперационные осложнения с позиций хирурга [Текст] / Б. С. Брискин // Инфекции и антимикробная терапия. – 2000. – Т.2, № 4. – С. 32–35.
- Морозова, Н. С. Проблемы и перспективы неспецифической профилактики внутрибольничных инфекций

- [Текст] / Н. С. Морозова // Проблемы медицинской науки та освіти. – 2004. – № 4. – С. 5–8.
3. Hancock, R. E. W. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins [Text] / R. E. W. Hancock, A. M. Carey // *J. Bacteriol.* – 1979. – Vol. 44, № 140. – P. 902–910.
4. Lieberman, M. M. *Pseudomonas* ribosomal vaccines: preparation, properties, and immunogenicity [Text] / M. M. Lieberman // *Infect Immun.* – 1978. – Vol. 21, № 1. – P. 76–86.
5. Pier, G. B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa* [Text] / G. Doring, G. B. Pier // *Vaccine.* – 2008. – Vol. 26, № 8. – P. 1011–24.
6. Дьяченко, В. Ф. Белковые компоненты клеточной оболочки синегнойной палочки и их антигенные свойства: автореф. дис. на соискание учен. степ. канд. биол. наук : спец. 03.00.07 “Микробиология” / В. Ф. Дьяченко. – Л., 1988. – 19 с.
7. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection in mice by genetic immunization against outer membrane protein F (OprF) of *Pseudomonas aeruginosa* [Text] / B. M. Price, D. R. Galloway, N. R. Baker [et al.] // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69, № 5. – P. 3510–3515.
8. Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice [Text] / H. E. Jr. Gilleland, M. G. Parker, J. M. Matthews [et al.] // *Infect. Immun.* – 1984. – № 44. – P.49–54.
9. Benz, R. Properties of chemically modified porin from *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes [Text] / R. Benz, H. Tokunaga, T. Nakae // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1984. – Vol. 769, № 2. – P. 348 – 356.
10. Городницька, Н. І. Результати дослідження дії енхансерів на нарощування біомаси мікроорганізмів *Pseudomonas aeruginosa*, перспективних для біотехнології [Текст] / Н. І. Городницька, А. В. Мартинов, Т. П. Осолодченко // Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Серія “Медицина”. – 2008. – № 797, Вип. 15. – С. 9 – 12.
11. Вивчення імуногенних властивостей ліпосомальних форм кашлюкових антигенів при ентеральному введенні / Е. М. Бабич, О. Е. Колоколова, Ю. Л. Волянський [та ін.] [Текст] // Експериментальна і клінічна медицина. – 2002. – № 3. – С. 87–90.
12. Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения. – РД 42-28-8-89. – М., 1989. – 31 С.
13. Порядок и методы контроля иммунологической безопасности вакцин. Общие методические принципы. – РД 42-28-10-90. – М., 1989. – 49 С.
14. Характеристика функциональной активности нейтрофилов крови человека с помощью реакции восстановления нитросинего тетразолия / А. Н. Маянский, М. Е. Виксман, П. К. Котельникова [и др.] [Текст] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1977. – № 6. – С. 108–110.
15. Ацильовані похідні білків та полісахаридів антигену синегнойної палички, розробка на їх основі вакцин [Текст] / А. В. Мартинов, В. І. Чернявський, Т. П. Осолодченко, М. В. Смілянська, С. Д. Перемот, О. А. Романова, Т. А. Сидоренко, Н. І. Ігумнова, Н. І. Городницька // Пошук та розробка нових профілактичних і лікувальних

протимікробних засобів, антисептиків, дезінфектантів та пробіотиків, присвячена 120-річчю Інституту мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова : збірник тез науково-практичної конференції з міжнародною участю, 20-21 листопада 2006 р. – Харків, 2006. – С. 126 – 128.

16. Краснопольский, Ю. М. Биотехнология иммунобиологических препаратов [Текст] / Ю. М. Краснопольский, М. И. Боршевская – Харьков: Издательство «Фармитэк», 2008. – 312 с.

17. Нуридинова, Н. Р. Отбор и иммунобиологические свойства штаммов синегнойной палочки, кандидатов в штаммы-продуценты [Текст] / Н. Р. Нуридинова // Журнал инфекция, иммунитет и фармакология. – 2000. – № 1. – С. 69–72.

УДК 579.841.1:579.253.2

**ВПЛИВ ХІМІЧНО-МОДИФІКОВАНОГО ГЛІКОПРОТЕЇДНОГО АНТИГЕНУ СИНЬОГНІЙНОЇ ПАЛИЧКИ НА ПОКАЗНИКИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ**  
**Городницька Н. І., Мартинов А. В.**

Розроблено новий хімічно-модифікований глікопротеїдний антиген синьогнойної палички для експериментальної вакцинації, який може використовуватись для подальшого отримання антисиньогнойних вакцин та діагностикумів. Антиген викликає індукцію синтезу високого рівня антисиньогнойних антитіл (від 1: 1280 для пероральної форми та 1: 5120 для ін'єкційної), активує фагоцитоз, викликає розвиток гиперчутливості уповільненого типу та не впливає на кількість антитілоутворюючих клітин до еритроцитів барану.

**Ключові слова:** хімічно-модифікований глікопротеїдний антиген синьогнойної палички, антитіла, ефективність, фагоцитарна активність, НСТ-тест, розвиток ГУТ, імуномодулююча активність.

УДК 579.841.1:579.253.2

**ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИ-МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЛИКОПРОТЕИДНОГО АНТИГЕНА СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**  
**Городницкая Н. И., Мартынов А. В.**

Разработан новый химически-модифицированный гликопротеидный антиген синегнойной палочки для экспериментальной вакцинации, который может использоваться для дальнейшего получения антисинегнойных вакцин и диагностикумов. Антиген вызывает индукцию антисинегнойных антител в высоких титрах (от 1: 1280 для пероральной формы и 1: 5120 для инъекционной), активизирует фагоцитоз, вызывает развитие гиперчувствительности замедленного типа и не влияет на количество антителообразующих клеток к эритроцитам барана.

**Ключевые слова:** химически-модифицированный гликопротеидный антиген синегнойной палочки, антитела, эффективность, фагоцитарная активность, НСТ-тест, развитие ГЗТ, иммуномодулирующая активность.

UDC 616.98: 579.841.11.

**INFLUENCE OF CHEMICALLY-MODIFIED GLICO-PROTEIDIC PSEUDOMONAS AERUGINOSA ANTIGEN ON THE IMMUNITY SYSTEM**  
**Gorodnitskaya NI., Martynov AV.**

We have elaborated a new chemically-modified glicoproteidic *Pseudomonas aeruginosa* antigen for experimental vaccination which can be used to receive vaccines and diagnosticums against *P. aeruginosa* in the future. The antigen causes the induction of high anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibodies titer (from 1: 1280 for peroral using and 1: 5120 for injection using), activates phagocytosis, stimulates the development of delayed type of hypersensitivity. It doesn't influence the count of antibody-forming cells against sheep erythrocytes.

**Key words:** chemically-modified glicoproteidic *Pseudomonas aeruginosa* antigen, antibodies, efficacy, phagocytic activity, NBT-test, development of delayed type of hypersensitivity, immunomodulatory effect.