

ФОТОДИНАМІЧНА ІНАКТИВАЦІЯ ШТАМІВ *P. AERUGINOSA* З МЕТОЮ ОТРИМАННЯ МУЛЬТИШТАМОВОЇ ВАКЦИНИ

¹Деркач С.А., ¹Мартинів А.В., ¹Городницька Н.І.,
¹Куцай Н.М., ²Габишева Л.С.

¹Державна установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І.І. Мечникова
Національної академії медичних наук України»
²Харківський національний медичний
університет

Вступ. Одним з основних збудників гнійно-запальних захворювань, у тому числі внутрішньолікарняних, залишається синьогнійна паличка – *P. aeruginosa* [1,2,3]. Збудник має серогруповий пейзаж, володіє полірезистентністю і високою стійкістю до дезінфектантів, асептиків і факторів зовнішнього середовища. При ефективність лікування псевдомонозів антибіотиками досить низька, а здатність до плівкоутворення на ранових та опікових поверхнях, на катетерах, протезах, тощо призводить до формування хронічного перебігу захворювання. Такий перебіг захворювання супроводжується виникненням свищів, абсцесів, пневмоній, відторгненням імплантатів та проблемами з протезуванням та відповідно до інвалідизації і, нерідко, до летальних наслідків [3,4]. Лікування у госпіталах поранених з вогнепальними ранами, опіками, пневмоніями, остеомієлітами, завжди пов'язане з тривалими перебуванням у стаціонарах, що значно збільшує ризик інфікування нозокоміальними бактеріями, серед яких домінують псевдомонади. Основним засобом боротьби з інфекціями на сьогоднішній день залишаються антибіотики, рівень ефективності яких стрімко знижується за рахунок формування антибіотикорезистентності. Саме стійкість клінічних штамів бактерій до антибіотиків є проблемою, визнаною ВОЗ найважливішою у Європейському регіоні [3]. Проблему боротьби з синьогнійною інфекцією можна розділити на кілька складових: по-перше – лікування хворих з синьогнійною інфекцією; по-друге – екстрена профілактика виникнення ускладнень, зумовлених *P. aeruginosa* (у хворих з пораненнями, опіками, з відкритими травмами, при інвазивних методах лікування); втретє – профілактика інфікування *P. aeruginosa* груп ризику (медичний персонал госпіталів, реанімаційних, хірургічних, опікових відділень, бійців АТО, хворих перед плановими хірургічними втручаннями, тощо). В першому і другому випадку імунні препарати повинні забезпечувати, перш за все, антитоксичний імунітет, який здатний швидко формуватись. Це можуть бути анатоксини, антитоксичні сироватки, лізати, аутовакцини. При використанні традиційних методів для створення вакцин, коли необхідно вилучити протективні антигени із бактеріальної клітини, виникає ряд проблем. По-перше, відсотковий вміст протективних антигенів незначний, тому при культивуванні необхідні великі об'єми біомаси, а

також необхідним є багаторазове очищення і концентрування вакцинних антигенів, що зумовлює високі виробничі трати. По-друге, наявність у вакцинах домішків, хімічних реагентів (фенолу, мертиоляту) може викликати небажані реакції організму вакцинованих [4,5,6]. Історія створення синьогнійних вакцин та оцінка перспективності їх застосування була відображена у нашій попередній публікації [7]. Основна проблема створення високоєфективних вакцин проти синьогнійної інфекції - це отримання вакцинних антигенів, які б викликали протективну відповідь незалежно від серотипу (і, навіть, підтипу) збудника, та залишались малотоксичними і неореактогенними. Пошук нових підходів до створення імунних препаратів продовжується в різних країнах світу. В Україні відсутні як діагностичні препарати для ідентифікації збудника і визначення специфічних антитіл, так і вакцинні препарати для профілактики і лікування синьогнійної інфекції. Отримання таких препаратів вітчизняного виробництва є перспективним, актуальним та соціально і економічно обґрунтованим. В основі запропонованого нами способу отримання мультиштамової синьогнійної вакцини лежить метод фотодинамічного знезараження бактеріальних культур. Можливість використання фотосенсибілізаторів і світла з метою пошкодження нуклеїнових кислот різних патогенів є відомою [8,9]. Важливою особливістю даного способу є їх універсальна ефективність для інактивації бактерій і вірусів незалежно від серотипу, фаговару, тощо.

Мета дослідження: розробити спосіб отримання фаголізатної мультиштамової синьогнійної вакцини із застосуванням методики фотодинамічної інактивації бактеріальних клітин.

Матеріали та методи

Для експериментів брали 7 регіональних штамів *P. aeruginosa*, вилучених із різних біотопів хворих на гнійно-запальні захворювання. У якості препаратів для отримання зразків вакцини використовували комерційний препарат - «Синьогнійний бактеріофаг» (ФДУП «НВО «Мікроген», м. Перм). У якості фотосенсибілізаторів використовували 1 % розчин вікасолу (виробництва Україна, «Дарниця») та 0,1 % розчин рибофлавіну (виробництва Україна, «Дарниця»). Для опромінення дослідних зразків застосовували лампу фото - полімерну автономну «Люксор» з потужністю світлового потоку 1200 мВт/см² (корисна потужність – 90 мВт/см²). Ультрафіолетове (УФ) опромінення здійснювали в ламінарному боксі бактерицидною лампою. Застосовувались загальноприйняті мікробіологічні та статистичні методи досліджень, регламентовані нормативними документами [10,11].

Результати та обговорення

Для отримання експериментальної мультиштамової вакцини брали 7 штамів *P. aeruginosa*. Для більш повного накопичення антигенів здійснювали фаголізис бактеріальних клітин з використанням комерційного та

адаптованого синьогнійного бактеріофагу, в якості фотосенсибілізаторів – рибофлавін та вікасол. Флавін-вмісні ферменти приймають участь в окисленні жирної, янтарної та інших кислот, інактивують та окислюють високотоксичні альдегіди, розщеплюють чужерідні D-ізомери амінокислот, які утворюються в результаті життєдіяльності бактерій. Рибофлавін (лактофлавін, вітамін В₂, формула C₁₇H₂₀N₄O₆) – один із найбільш важливих водорозчинних вітамінів, кофермент багатьох біохімічних процесів. Він стійкий до кислої середовища, чутливий до видимого та УФ - опромінення [8,9]. Рибофлавін при опроміненні стає інгібітором токсичності ендо- та екзотоксинів. Навіть ботулотоксин, який є одним з найбільш відомих та сильних токсинів, інактивується таким способом, що робить його перспективним засобом лікування ботулізму [12,13]. В літературі є дані про можливість використання в якості фотосенсибілізатору, у тому числі по відношенню до антибіотикорезистентних культур, вітаміну К – вікасолу [14]. Вікасол (вітамін К₃, менадіона натрія бісульфат – синтетичний водорозчинний аналог вітаміну К (торгівельна назва вікасол)). Роль вітаміну К в організмі людини: впливає на біосинтез прокоагулянтів, впливає на біоенергетику і ряд процесів анаболізму для обміну мікроергічних сполук, для утворення АТФ. Зв'язування з білками плазми має оборотний характер, виводиться нирками та з жовчю винятково у вигляді метаболітів (моносультату, фосфату і диглюкуроніду – 2 – метил-1,4 – нафтохінону). Високі концентрації вітаміну К у калі зумовлені тим, що він синтезується кишковою мікрофлорою. В медицині використовується досить широко (навіть новонародженим).

У дисертаційній роботі Гончарова А.С. переконливо показана динаміка взаємодії фагу і бактеріальних клітин. Шляхом спектрофотометричної детекції показано, що при значеннях множинного інфікування (МОІ) 5-50 фагових частин на одну бактеріальну клітину, бактеріофаг викликає повний лізис культури чутливого штаму через 20-60 хвилин після початку фагової інфекції, в той час, як при МОІ = 0,5 лізис

відбувається через 2 години. Ці дані були підтверджені методом атомно-силової мікроскопії [15]. Виходячи з цього, нами був визначений (методом Аппельмана) титр суміші наших адаптованих фагів, що дозволило визначити дозу фагу, необхідного для відпрацювання методики фаголізу в експериментах з різними добавками (рибофлавіном, вікасол). При титрі фагу 1: 10⁶ повний лізис тест-культур псевдомонад зафіксовано через 2-18 годин інкубації при температурі + 35⁰ С. Слід, однак, зазначити, що ріст поодиноких колоній все ж таки має місце при висіві із суміші псевдомонади + адаптовані бактеріофаги на 3-5 добу. Це можна розцінювати як наслідок гетерогенності популяції, відсутності синхронізації швидкості росту бактеріальних культур, недостатньої дози фагу при одноразовому його додаванні до культури, оскільки адсорбція фагу на клітини (не лише на живі, здатні до розмноження, а й на мертві) є незворотною.

Без опромінення ці речовини в будь-яких концентраціях не впливали на ріст культур *Pseudomonas aeruginosa*, в той час, як при певних дозах (вікасолу – 3,5 мкг/мл, рибофлавіну – 0,2 мкг/мл) та параметрах опромінення мало місце зниження або відсутність росту бактерійних культур після їх висіву із дослідних зразків. Окремо визначали вид та параметри опромінення культур. Режим опромінення визначали експериментально на чистих культурах штамів *P. aeruginosa*, взятих в різних концентраціях (від 10¹ до 10⁹ КУО/мл, в різних часових інтервалах (5,0-10, 0-15, 0-20, 0-30, 0-40, 0 хв), з різними концентраціями рибофлавіну та вікасолу, з додаванням до зразків бактеріофагу та без його додавання). Численні дослідні показали, що оптимальними параметрами для опромінення зразків є 20 хвилин при використанні УФ променів і 30 хвилин – при застосуванні денного світла фотополімерної лампи при 440 нм. Суттєвої переваги одного способу над іншим не виявлено ($\chi^2 < 0,05$). Для підвищення фотосенсибілізуючого ефекту використовували поєднане застосування вікасолу і рибофлавіну (табл.1).

Таблиця 1. Результати визначення дії бактеріофагу, рибофлавіну, вікасолу та опромінення на суміш культур *P. aeruginosa*

Проба №	Інгредієнти проби	Вид опромінення	Показники росту культур (lg КУО/мл ± m)	
			Наявність росту : 24 год.	Наявність росту: 5 діб
1.	<i>P. aeruginosa</i> * (10 ⁶ КУО/мл) 1,0 мл + фізіологічний розчин 2,0 мл (контроль)	без опромінення	6,6±0,02	7,1±0,07
		опромінення ФПЛ**	6,4±0,06	7,5±0,06
2.	<i>P. aeruginosa</i> 1,0 мл + фізіологічний розчин 1,5 мл + 0,5мл рибофлавіну	опромінення ФПЛ	1,8±0,03	2,7±0,04
		опромінення УФ***	1,4±0,06	2,5±0,06
3.		опромінення ФПЛ	0	1,3±0,09

	<i>P. aeruginosa</i> 1,0 мл + фізіологічний розчин 0,5мл + 0,5мл рибофлавіну + вікасол 1,0 мл	опромінення УФ	0	0
4.	<i>P. aeruginosa</i> (10^6 КУО / мл) 1,0 мл + 0,5мл 0,1 % рибофлавіну + вікасол 1,0 мл + синьогнійний бактеріофаг	опромінення ФПЛ	0	0
		опромінення УФ	0	0

Примітки: * - *P. aeruginosa* у вихідній концентрації 10^6 КУО/мл (lg 6,0) по Mc –Farland, ** - опромінення світлом фотополімерної лампи, *** - опромінення ультрафіолетом протягом 20 хвилин.

Запропонований спосіб отримання вакцини шляхом фотодинамічної інактивації культур-кандидатів детально відображено у патенті на корисну модель [16]. Як свідчать отримані результати, найбільш перспективним способом отримання фаголізатної псевдомонозної вакцини, яка б була незараженою (убитою) та не містила в собі токсичних фракцій, є використання специфічних або адаптованих до культур-кандидатів *P. aeruginosa* бактеріофагів, рибофлавіну та вікасолу з наступним опроміненням світлом фотополімерної лампи або УФ. Враховуючи особливості синьогнійної інфекції, відсутність епідеміологічної загрози з одного боку та тяжкість перебігу захворювань, високу значимість при формування внутрішньолікарняних спалахів – з іншого боку, проведення масової вакцинації населення єдиною універсальною синьогнійною вакциною є недоцільним, а формування специфічного захисту в окремих закладах та групах ризику – важливим та перспективним. До переваг отриманої мультиштамової фаголізатної вакцини слід віднести:

- наявність повного набору антигенів білкового походження (найбільш консервативні антигени, характерні для всіх серогруп та серотипів циркулюючих штамів), розчинних фракцій, оболонки, мембран, незараженого екзотоксину;
- стабільна руйнація ДНК та РНК бактеріальних клітин;
- застосування у якості фотосенсибілізаторів вітамінних препаратів (рибофлавіну та вікасолу), які є абсолютно нешкідливими для макроорганізму;
- відсутність застосування хімічних речовин, складних технологій, необхідності очистки препаратів;
- можливість приготування незначних об'ємів вакцин із конкретно циркулюючих штамів *P. aeruginosa* в тому чи іншому регіоні, чи у лікувальному закладі, чи індивідуально хворому без особливих матеріальних затрат і потреб у складному обладнанні, тощо.

Відпрацьований на моделі *P. aeruginosa* спосіб отримання імуногенів може бути успішним для отримання вакцин і з інших бактерій – збудників гнійно-запальних захворювань (стафілококів, стрептококів, кишкової палички, протею, тощо) та конструювання полівалентних вакцинних препаратів, що підкреслює наукову-практичну значимість роботи.

Висновок. Показана перспективність нового підходу до отримання вакцинних препаратів шляхом інактивації штамів-кандидатів фотодинамічним методом. Показана доцільність застосування специфічних або адаптованих до культур-кандидатів

P. aeruginosa, бактеріофагів, концентрація яких повинна бути не менш 10^6 фагових частин в 1 мл. Визначені параметри використання фотосенсибілізаторів та режиму їх опромінення: рибофлавін додається у пропорції 1: 6 (0,17 мкг/мл), вікасол – 1: 3 (3,33 мкг/мл), опромінення зразків – 20 хвилин УФ або 30 хвилин світлом фотополімерної лампи при довжині хвилі відповідно 280 нм та 440 нм. Відсутність токсигенності та наявність протективних властивостей отриманих вакцинних зразків, (показане при початковому експериментальному вивченні на лабораторних мишах), свідчить про перспективність подальшого їх доклінічного вивчення.

Photodynamic inactivation of *P. aeruginosa* strains in order to obtain multistage vaccine

Derkach S.A., Martinov A.V., Gorodnytska N.I., Kutsai N.M., Gabisheva L.S.

Introduction. One of the main pathogens of purulent-inflammatory production, while in the interior remains *Pseudomonas aeruginosa*. The pathogen has a serogroup landscape, uses a polyresistant of its own and high impurities to disinfectants, asepsis and factors that exist in most. When antibiotics are detected, the effectiveness is insufficient, and trust in the hymen is created on the early and burn surfaces, on catheters, in the formation of a chronic course, which is in overuse of products, and in the absurd, pneumonia, implant differences and problems with prosthetics, which still have to continue. The problem with creating highly effective vaccines against *Pseudomonas aeruginosa* infection is the availability of vaccine antigens that have shown a protective response independent of serotype and under the type of pathogen, and have been found to be malignant. toxic and non-reactogenic. Look for new products aimed at creating the most modern drugs that are studied in different countries. In Ukraine, there are no diagnostic drugs for the identification of the pathogen and the determination of specific antibodies, and vaccines for the prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection. Obtaining such drugs of domestic production is promising, relevant and socially and economically justified. **Materials and methods.** The basis of our proposed method of obtaining a multistage *Pseudomonas aeruginosa* vaccine is the method of photodynamic disinfection of bacterial cultures. An important feature of this method is its universal effectiveness of inactivation of bacteria and viruses, regardless of serotype, phagovar. For the experiment, 7 regional strains of *P. aeruginosa* isolated from different habitats stored in purulent-inflammatory sites were studied. As drugs for obtaining samples of the vaccine used a commercial drug -

"Pseudomonas aeruginosa bacteriophage" (FDUP "NGO" Microgen", Perm). As photosensitizers used 1% solution of vikasol (manufactured in Ukraine, "Darnitsa") and 0.1% solution of riboflavin (manufactured in Ukraine, "Darnitsa"). To use the photodynamic effect, we used a photo-polymer stand-alone lamp "Lux" with a powerful luminous flux of 1200 mW / cm² (power - 90 mW / cm². Ultraviolet (UV) radiation was used in the laminar box with a bactericidal lamp. The titer of a mixture of our adapted phages was determined (by the Appelman method), which allowed to determine the dose of phage required for testing the phagolysis technique in experiments with various additives (riboflavin, vikasol). **Results and discussion.** At a phage titer of 1: 10⁶, complete lysis of test-culture pseudomonads was recorded after 2-18 hours of incubation at a temperature of + 35⁰ C. It should be noted that the growth of single colonies still occurs when sowing from a mixture of pseudomonads + adapted bacteriophages for 3-5 days. Without irradiation, these substances in any concentrations did not affect the growth of *Pseudomonas aeruginosa* cultures, while at certain doses (vikasol - 3.5 µg / ml, riboflavin - 0.2 µg / ml) and irradiation parameters there was a decrease or lack of growth of bacterial cultures after sowing from experimental samples. The type and parameters of crop irradiation were determined separately. The irradiation regime was determined experimentally on pure cultures of *P. aeruginosa* strains taken in different concentrations (from 10¹ to 10⁹) CFU / ml, at different time intervals (5,0-10, 0-15, 0-20, 0-30, 0 - 40, 0 min), with different concentrations of riboflavin and vikasol, with the addition of bacteriophage samples and without its addition). The optimal parameters for irradiation of the samples are 20 minutes when using UV rays and 30 minutes - when using daylight photopolymer lamp. Significant advantages of one method over another are not presented. To increase the photosensitizing effect, the combined use of vikasol and riboflavin was used. The most promising way to obtain a phagolytic pseudomonas vaccine that is decontaminated and does not contain toxic fractions is the use of specific or adapted to candidate cultures *P. aeruginosa* bacteriophages, riboflavin and vikasol, followed by irradiation with light or photopopulation. The method of obtaining immunogens developed on the model of *P. aeruginosa* can be successful for obtaining vaccines from other bacteria - pathogens of purulent-inflammatory diseases (staphylococcus, streptococcus, Escherichia coli, Proteus, etc.) and the design of polyvalent vaccines.

Keywords: Photodynamic inactivation, *Pseudomonas aeruginosa*, multistage vaccine

References

1. Veesenmyer J. L., Hauser A. R., Lisboa T. Pseudomonas aeruginosa virulence and therapy: evolving translational strategies J. Crit. Care Med. 2009. V.37. No.5. P.1777-1786.
2. Shahinian IA, Chernuha M. Yu non-fermenting Gram-negative bacteria in the etiology of nosocomial infections: clinical, microbiological and epidemiological

- features. Wedge. mikrobiol. and Antimicrobial. himioter. 2005. №3. P. 271-285.
3. Paterson D. L. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species. Clinical Infectious Diseases. 2006. T. 43. № 2. P. 43-48.
4. Bumann D., Behre C., Behre K., Herz S., Gewecke B., Gessner J. E. et al. Systemic, nasal and oral live vaccines against Pseudomonas aeruginosa: a clinical trial of immunogenicity in lower airways of human volunteers. Vaccine. 2010. № 28(3). P. 707-713.
5. Doring G., Meisner C., Stern M. A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a Pseudomonas aeruginosa flagella vaccine in cystic fibrosis patients. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. 2007. Vol. 104. №26. P.1020-1025.
6. Westritschnig K., Hochreiter R., Wallner G. et al. A randomized, placebo-controlled phase I study assessing the safety and immunogenicity of a Pseudomonas aeruginosa hybrid outer membrane protein OprF/I vaccine (IC43) in healthy volunteers. Human vaccines and immunotherapeutics. 2014. №10 (1). P. 170-183.
7. Gorodnitskaya N. I., Gabysheva L. N., Derkach S. A., Martynov A.V. Immunoprophylaxis of Pseudomonosis: achievements and perspectives. Annals of Mechnikov's Institute. m. Xapкiv, 2018. N 2. P. 5-15.
8. US. Patent Appl. № 2003026770 FOR DAMAGE nucleic acid using riboflavin and light. 2012.
9. Meerovich G. A., Tiganova I. G., Makarova E. A., Meerovich I. G. et al. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins, J. of Physics: Conference Series. 2016. Vol. 691.
10. Basic methods in clinical laboratory studies WHO Bacteriology, Zheneva. M.: Meditsina, 1994. 92 p.
11. Lapach SM, Chubenko AV Babich PN Statistical methods in biomedical research using Excel. K.: "MORION". 2001. 408 p.
12. Eubanks L. M., Dickerson T. J., Janda K. D. Vitamin B2-mediated cellular photoinhibition of botulinum neurotoxin A. FEBS Letters. 2005. № 579(24). P.5361-5364.
13. Liang J.Y. Blue light induced free radicals from riboflavin on E. coli DNA damage. Journal of photochemistry and photobiology. B: Biology. 2013. №119. P.60-64. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.12.007>.
14. Yuan G. New activity for old drug: In vitro activities of vitamin K 3 and menadione sodium bisulfite against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. African Journal of pharmacy and pharmacology. 2014. P. 451-454.
15. Goncharov A., Solomenny B., Aslanov B. Genotypic structure and susceptibility to antimicrobial agents of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in Russian burn intensive care units. International journal of antimicrobial agents. 2007. Vol. 29. №2. P. 655.
16. Method for the vaccine preparation for prevention and treatment of pseudomonosis: Application for UA Patent. 201908730; appl. 19/07/2019, positive solution to obtain a patent from 12.12.2019.