

Коротке повідомлення

**ПОКАЗНИКИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО
ГУМОРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ
ІМУНІЗАЦІЇ АНТИСИНЬОГНІЙНИМИ
ВАКЦИНАМИ**

**Деркач С.А., Мартинов А.В., Романова О.А.,
Ігумнова Н.І., Сидоренко Т.А.,
Дяченко В.Ф., Марющенко А.М.**

**Інститут мікробіології та імунології
ім. І.І. Мечникова НАМН України**

Вступ. Проблема синьогнійної інфекції залишається актуальною в усьому світі, оскільки етіологічна роль *P. aeruginosa*, як одного з основних збудників гнійно-запальних захворювань, не зменшилась, а в умовах наявності воєнних конфліктів лише зросла, а ефективність засобів боротьби з нею навпаки викликають занепокоєння. Причиною цього є постійно зростаюча антибіотикорезистентність збудника, формування нозокоміальних полірезистентних штамів, стійких не лише до антибіотиків, а і до бактеріофагів, антисептиків та дезінфектантів. Засоби специфічної імунізації (лізати, анатоксини, вакцини) довгий час розробляються вченими різних країн, але практичного застосування так і не здобули із цілого ряду причин. Ефективність експериментальних вакцин у значній мірі залежить від гомологічності вакцинного та інфікуючого штаму, від особливостей преморбідного стану реципієнта, від схеми імунізації, тощо. До того ж для захисту від патогену необхідна стимуляція клітинних механізмів адаптивного імунітету, що контролює імунні реакції на етапах розпізнавання чужорідних антигенів, їх визначення та знищення. Не менш доцільною є активація гуморальної ланки імунної системи [1,2].

Нами був розроблений спосіб отримання вакцин із застосуванням новітнього методу фотодинамічної інактивації бактерій-кандидатів, що дозволяє без зміни антигенного складу білкових компонентів селективно руйнувати РНК та ДНК мікроорганізмів, забезпечуючи, тим самим, специфічну імуногенність та відсутність реактогенності імунопрепарату [3].

Експериментальним шляхом були визначені оптимальні параметри уніфікованого способу фотодинамічної інактивації штамів-кандидатів: застосування двох фотосенсибілізаторів – рибофлавіну мононуклеотиду та вікасолу, послідовне опромінення двома видами променів – ультрафіолетовим та видимим світлом фотополімерної лампи, центрифугування суміші при 8 тис. г. та ресуспендування осаду.

Вивчення показників токсичності та реактогенності отриманих серій синьогнійної вакцини підтвердило їх нешкідливість для лабораторних тварин (показники життєдіяльності та вага тварин в дослідній групі не відрізнялась у порівнянні з контрольною).

Для наукового обґрунтування протективної активності вакцин, отриманих запропонованим

способом, необхідне вивчення таких важливих показників вакцинального імунітету, як титри специфічних імуноглобулінів, що і слугувало основним завданням даного дослідження.

Мета дослідження. Метою дослідження було визначення перспективності фотодинамічного способу знезараження штамів мікроорганізмів, шляхом оцінки показників гуморального імунітету у вакцинованих тварин.

Матеріали та методи/ У якості штамів-кандидатів застосовували, свіже вилучені від хворих та поранених з ускладненнями, культури *P. aeruginosa*. Розробленим способом було напрацьовано по три серії вакцин із актуальних штамів.

В експериментах на лабораторних тваринах (білі лабораторні миші) проведено порівняльне вивчення імуностимулюючої активності протисиньогнійних вакцин, отриманих двома способами: термічно інактивованої (ТІВ) [4] та отриманої розробленим способом фотодинамічної інактивації регіонально циркулюючих та нозокоміальних штамів *P. aeruginosa* (ФІВ) [3]. Отримані результати досліджень природного та адаптивного імунітету вже були частково опубліковані [5,6,7]. Вони підтверджують активуючий вплив синьогнійних вакцин на клітинні механізми імунної відповіді. В якості критеріїв імуногенності взяті показники, що відображають сероконверсію – максимальний (max) та середній титри специфічних антитіл після першої і другої імунізації даними вакцинами; кратність підвищення титрів; відсоток тварин, що відповіли продукцією антитіл у максимальному титрі. Оцінку проводили за результатами реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) зі специфічним антигеном *P. aeruginosa*, отриманим із того самого штаму, що використовувався для зараження вакцинованих і контрольних (невакцинованих) тварин. РГГА являє собою метод виявлення антибактеріальних антитіл у сироватці крові, що базується на феномені відсутності аглютинації еритроцитів під дією антигена у присутності імунної до нього сироватки крові [8]. Готували двократні розведення сироватки у ямках плексигласового планшету, починаючи з 1:10 до 1:640 і вище в об'ємі 0,2 мл. До кожного розведення сироватки додавали 0,2 мл робочої дози антигену (4 АО). Суміш перемішували у шейкері при кімнатній температурі і залишали при $T = 20 \pm 2$ °C на 30 хв., потім у кожному лунку додавали 0,4 мл 1% суспензії курячих еритроцитів. Суміш повторно перемішували у шейкері, залишали при $T = 20 \pm 2$ °C на 40-45 хв. (до осідання еритроцитів у контролі), після чого враховували результати реакції. За наявності специфічних антитіл у сироватці спостерігалася затримка аглютинації еритроцитів. За титр сироватки брали граничне розведення, що викликало повну затримку гемаглютинації.

Затримка гемаглютинації вказує на відповідність типу антигену і взятій сироватки;

відсутність затримки гемаглютинації свідчить про невідповідність типу взятої сироватки. Препарат враховують як специфічний, якщо він не реагує в РГГА з гетерологічною сироваткою.

Об'єктом дослідження була сироватка крові експериментальних тварин, отримана у різні терміни після імунізації.

Результати цього дослідження наведені у таблиці 1.

Результати та обговорення

Табл.1 Характеристика сероконверсії вакцин відносно *P.aeruginosa* після одноразової імунізації

Вакцинні препарати (n=11)	Показники титрів синьогнійних антитіл		
	Титри максимальні антитіла(max)	Частота max титру у групі (%)	Середні титри антитіл
1	2	3	4
ФІВ	1 : 160*	80	1 : 140
ТІВ	1 : 80*	70	1 : 60
Контрольна група	1 : 10	10	1 : 1

Примітка: ФІВ - фотоінактивована вакцина; ТІВ - термоінактивована вакцина; * - достовірність розбіжностей $p \leq 0,05$

Внаслідок одноразової імунізації ФІВ максимальні титри специфічних антитіл у 16 разів перевищували контрольні значення у більшості мишей (у 80,0 %). У вакцинованих ТІВ рівень гомологічних антитіл до синьогнійного антигену у 70,0 % мишей перевищував контрольні показники у 8 разів.

Після другої імунізації ФІВ знову продемонструвала показники, що перевершували ефективність препарату порівняння (середній титр ФІВ 1 : 620 проти 1 : 260 титру ТІФ) (таблиця 2).

Табл 2. Характеристика сероконверсії вакцин після дворазової імунізації

Вакцинні препарати (n=11)	Титри антитіл (max)	Частота max титру у групі (%)	Титри антитіл (середні показники)
1	2	3	4
ФІВ	1 : 640*	70	1 : 620*
ТІВ	1 : 320*	50	1 : 260*
Контроль	1 : 10	10	1 : 1

Примітка : ФІВ- фотоінактивована вакцина; ТІВ- термоінактивована вакцина; * - достовірність розбіжностей $p \leq 0,05$

Висновки. На основі проведених досліджень можна зробити висновки, що фотоінактивована вакцина викликає продукцію гомологічних антитіл, що достовірно перевершує результати від дії термоінактивованої вакцини. Виходячи з середнього рівня титру це мало місце уже на етапі одноразової (першої) імунізації. Тобто, обидва препарати викликали продукцію достатнього рівня захисних антитіл, згідно з правилами Європейської Фармакопеї [9]. Таким чином, визначення в експерименті імуностимулюючих властивостей вакцини, розробленої з застосуванням фотодинамічного способу інактивації штамів- кандидатів, довело її високу активність та превалюючу ефективність стосовно продукції специфічних імуноглобулінів проти *P. aeruginosa*, що вказує на перспективність її подальшого всебічного вивчення.

Indicators of postvaccination humoral immunity in immunization with anti-pseudomonas vaccines
Derkach S.A., Martynov A.V., Romanova O.A., Igumnova N.I., Sydorenko T.A., Dyachenko V.F., Maryushchenko A.M.

Introduction. The problem of *Pseudomonas aeruginosa* infection remains relevant worldwide, since the etiological role of *P. aeruginosa* as one of the main causative agents of purulent inflammatory diseases has not decreased, but has only increased in the context of military conflicts, and the effectiveness of means of combating it, on the contrary, is of concern. The study of the toxicity and reactogenicity of the obtained batches of the purulent vaccine confirmed their harmlessness to laboratory animals (vital signs and weight of animals in the experimental group did not differ compared to the control group). To scientifically substantiate the protective activity of the vaccines obtained by the proposed method, it is necessary to study such important indicators of vaccine immunity as titers of specific immunoglobulins, which was the main objective of this study. **Materials and methods.** *P. aeruginosa* cultures freshly isolated from patients and wounded with complications were used as candidate strains. Three series of vaccines from the actual strains were obtained using the developed method. In experiments on laboratory animals (white laboratory mice), a comparative study of the immunostimulatory activity of anti-pseudomonas vaccines obtained by two methods was carried out:

thermally inactivated (TIV) and photodynamic inactivation of regionally circulating and nosocomial strains of *P. aeruginosa* (PIV). The criteria for immunogenicity were indicators reflecting seroconversion - maximum (max) and average titers of specific antibodies after the first and second immunization with these vaccines; the multiplicity of titers; the percentage of animals that responded with antibody production in the maximum titer. The evaluation was based on the results of the hemagglutination inhibition reaction (HIR) with a specific antigen of *P. aeruginosa* obtained from the same strain used to infect vaccinated and control (unvaccinated) animals. **Results and discussion.** As a result of a single immunization with PIV, the maximum titers of specific antibodies were 16 times higher than the control values in most mice (80.0%). In the TIV-vaccinated mice, the level of homologous antibodies to the purulent antigen in 70.0% of mice was 8 times higher than the control values. After the second immunization, PIV again demonstrated performance superior to that of the comparison product (average PIV titer 1:620 vs. 1:260 for TIF). **Conclusions.** The production of homologous antibodies caused by immunization of animals with photoinactivated vaccine significantly exceeds the results of similar exposure to heat-inactivated vaccine. Based on the average titer level, this occurred already at the stage of a single (first) immunization. Thus, the determination of the immunostimulatory properties of the vaccine developed using the photodynamic method of inactivation of candidate strains in the experiment proved its high activity and predominant effectiveness in the production of specific immunoglobulins against *P. aeruginosa*, which indicates the prospects for its further comprehensive study.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, vaccines, photoinactivation, seroconversion, mice

References

1. Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alay, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*. 21(5). 280-295.
2. Killough, M., Rodgers, A. M., & Ingram, R. J. *Pseudomonas aeruginosa*: Recent advances in vaccine development. 2022. *Vaccines*. 10(7). 1100.
3. Derkach S.A., Martynov A.V., Kutsai N.M., Gorodnytska N.I. Method for obtaining a vaccine for the prevention and treatment of pseudomoniasis. Ukrainian Utility model patent No. 1432248 dated 27.07.2020. 5C.
4. Giedrys-Kalemba S., Czernomysy-Furowicz D., Fijałkowski K., Jursa-Kulesza J. Autovaccines in individual therapy of Staphylococcal infections. In pet-to-man travelling Staphylococci. Academic Press. 2018. P. 253-264.
5. Derkach, S., Martynov, A., Gorodnitskaya, N., Kutsay, N., & Romanova, H. (2022). Influence of photodynamically inactivated *Pseudomonas aeruginosa* vaccine on cytokine secretion by mouse dendritic cells. *Annals of Mechnikov's Institute*. (2). 51–54. Retrieved from <http://journals.urau.edu.ua/ami/article/view/257143>.

6. Derkach SA, Gorodnitskaya NI, Romanova OA, Gabysheva LS Functional activity of peripheral blood leukocytes of mice immunized with a purulent vaccine. Modern research in world science. Proceedings of the 2nd International scientific and practical conference. SPC “Sci-conf.com.ua”. Lviv, Ukraine. 2022. Pp. 147-151. URL: <https://sci-conf.com.ua/iimezhdunarodnaya-nauchno-prakticheskaya-konferentsiya-modern-research-in-world-science-15-17-maya-2022-goda-lvov-ukraina-arhiv/>.
7. Derkach S.A., Gorodnytska N.I., Romanova O.A., Gabysheva L.S. Influence of photoinactivated blue-purple vaccine on adaptive immunity (experimental studies). Modern directions of scientific research development. Proceeding of the 15th International scientific and practical conference. BoScience Publisher. Chicago, USA. 2022. Pp. 37-44. URL: <http://sci-conf.com.ua>.
8. Derkach, S., Martynov, A., Gorodnitskaya, N., Kutsay, N., & Romanova, H. (2022). The effect of photodynamically inactivated purulent vaccine on cytokine secretion by dendritic cells in mice. *Annals of Mechnikov's Institute*. (2). 51-54.
9. Derkach, S. A., Gorodnitskaya, N. I., & Romanova, O. A. (2022, August). Influence of photoinactivated purulent vaccine on adaptive immunity (experimental studies). In The 15th International scientific and practical conference “Modern directions of scientific research development” (August 10-12, 2022) BoScience Publisher. Chicago, USA. 2022. 482 p. (p. 37).