

ЕФЕКТИВНІСТЬ ТЕРАПІЇ АУТОВАКЦИНАМИ ЛОКАЛЬНИХ УРАЖЕНЬ СИНЬОГНІЙНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ).

Світлана Деркач, Валентина Дяченко, Надія
Скляр, Анатолій Марющенко Наталія Куцай

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.
Мечникова НАМН України», м. Харків,
Україна

Синьогнійна Інфекція має різні клінічні форми, різну локалізацію та тяжкість перебігу. Клінічні підходи до лікування різних категорій пацієнтів дещо відрізняються. При септичних проявах інфекції важливим є застосування антибіотикотерапії, при переході в хронічний процес та при місцевих ураженнях можливе застосування вакцинотерапії. Технології виробництва аутовакцин були розроблені нами в попередні роки на основі використання новітнього методу фотодинамічної інактивації бактерій-кандидатів.

Синьогнійна інфекція має різні клінічні форми : від сепсису, пневмонії, пієлонефриту, ускладнень перебігу бронхіальної астми та перитоніту до локальних уражень - інфікованих опікових, травматичних та вогнепальних ран, тощо [1,2].

В умовах воєнних дій може мати місце різна локалізація і тяжкість специфічного інфікування *P. aeruginosa*. Клінічні підходи до лікування різних категорій хворих дещо відрізняються. При септичних проявах інфекції важливим для сприятливого прогнозу перебігу хвороби є раннє застосування антибіотикотерапії та інших симптоматичних засобів і лише при згасанні гострої фази захворювання, при переході до хронічного процесу, стає можливим використання аутовакцинотерапії.

У боротьбі з синьогнійною інфекцією окремої уваги заслуговує такий напрямок, як розробка технології виготовлення моно- та мультіштамових вакцин із локально циркулюючих чи нозокоміальних штамів та аутовакцин із вилучених від конкретних хворих культур *P. aeruginosa* [3].

Такі технології були розроблені нами у попередні роки на основі застосування новітнього методу фотодинамічної інактивації бактерій - кандидатів, що дозволяє селективно руйнувати їх ДНК та РНК, зберігаючи при цьому антигенний склад клітинних компонентів , забезпечуючи, тим самим, специфічну активність імунопрепарату [4,5,6]. Аутовакцини є перспективним засобом боротьби з первинним інфікуванням бойових уражень бійців як при їх шпиталізації, так і при формуванні хронічного перебігу синьогнійної інфекції, особливо при опіках, при травмуванні протезами, при остеомієлітах, тощо.

Аутовакцинотерапія забезпечує індивідуальний підхід при можливості застосування в амбулаторних умовах шляхом використання як у вигляді монотерапії, так і в комплексі з традиційними методами лікування [7,8]. Аутовакцина, як відомо, здатна знизити рівень сенсibiliзації організму, є ефективним засобом боротьби з осередками хронічної інфекції, і дає хороший ефект тоді, коли бактерії-збудники проявляють антибіотикорезистентність, а також у випадках, коли призначення антибіотиків та антисептиків протипоказано (лікарська алергія) [9,10,11].

Метою даного дослідження було вивчення ефективності застосування аутовакцинотерапії при локальних ранових ураженнях, ускладнених синьогнійною інфекцією.

Для цього, перш за все, ми розробили модель отримання синьогнійної інфекції локального ураження у лабораторних тварин [12].

Матеріали та методи

Для моделювання локального запального процесу були використані білі нелінійні миші вагою 18- 21 г та щурі вагою 180-200 г При одноразовому підшкірному введенні інфікуючої дози культури *P. aeruginosa* місцева реакція розвивається через 12 годин, а на 7-9 день з моменту інюкації мікроорганізмів уже відбувається затухання процесу. Тому для пролонгування перебігу місцевої інфекції ми застосували розчин хлористого кальцію Для створення осередку місцевої синьогнійної інфекції на депільованій боковій поверхні тварин, ретельно видаляли вовну площею до 20 мм² у щурів та до 10 мм² у мишей. Шкіру обробляли 70⁰ спиртом. В отриманій «чистій» зоні підшкірно вводили 0,2 мл хлористого кальцію (100 мг/мл) і наглядали протягом 2-3 діб до утворення некротичної скоринки, після чого вводили під скоринку 0,2 мл культури *P.aeruginosa* у дозі 6 LD 50. Дозу LD 50 для кожного штаму, задіяного в експерименті, попередньо визначали експериментальним шляхом. Вона дорівнювала 1·10⁹ КУО /мл .

Процедуру повторювали через 24 - 48 годин (знову вводили під скоринку

0,2 мл культури синьогнійної палички, доведеної до концентрації, рівній 3·10⁹ КУО/мл. Характерне гнійне запалення осередку інфікованої шкіри тривало, в середньому, 16 - 21 день, що дозволило провести експериментальне вивчення ефективності застосування аутовакцин з терапевтичною метою.

В експерименті на лабораторних тваринах ми використовували дві схеми введення аутовакцин: 1) схема I: внутрішньочеревне (дворазово по 0,5 мл з інтервалом 5 днів), 2) схема II: підшкірне (триразово по 0,2 мл з інтервалом 3 дні)

Після виникнення у тварин осередків запалення (на 5-8 день після повторного інфікування)

частині з них вводили аутовакцину, виготовлену з гомогенного штаму, а частина залишалась без лікування (контрольна група). Оцей кусок краще направити в розділ матеріали та методи

Слід зазначити, що відомі з літератури існуючі схеми введення аутовакцин суттєво різняться між собою. Наявність відмінностей можна пояснити тим, що вакцини були отримані різними способами, пацієнти мали різні клінічні прояви захворювання, викликані різними збудниками, а також мали різні імунологічні статуси. Загально визнаної схеми вакцинації тварин, як і єдиної моделі локального формування осередку інфекції, немає.

Ефективність вакцинотерапії оцінювали по показниках клінічного прояву інфекції, термінів заживлення ран та виживаності у порівнянні з контрольною (не лікованою) групою тварин.

Результати та обговорення

На основі розроблених нами моделей отримання місцевих проявів синьогнійної інфекції були проведені експерименти на щурах та білих безпородних мишах. Інфікування шкірних ран

здійснювали свіжевилученими від стаціонарних хворих штамами *P. aeruginosa* (№№ 8, 145, 148).

У контрольній групі тварин на 14 день експерименту епітеліальний шар шкіри не відновлювався. Спостерігалася наявність гнійного ексудату, почервоніння та припухлості навколишніх тканин. Епітелізація рани відбулася лише на 20-25 добу. Дві миші з контрольної групи загинули в перші п'ять днів після зараження. Ще дві – на 9-й та 11-й день відповідно. У групі дослідних тварин із дворазовим внутрішньочеревним введенням вакцини (у групі I) загинула одна миша на другий день після введення вакцини, що може бути пов'язаним з травматичним ураженням кишечника при ін'єкції.

Загоєння ранових поверхонь було помітно на 8-12 день, після введення другої дози вакцини (таблиця 1). Не менш ефективним виявився спосіб триразового підшкірного введення вакцини з інтервалом у два дні. Аналогічна тенденція до прискорення регенеративних процесів уражених ділянок шкіри під дією вакцинотерапії спостерігалася і у дослідних щурів (таблиця 2).

Таблиця 1. Показники строків заживлення ран (у днях) в інфікованих білих мишей при лікуванні аутовакцинами

Штам інфікува ння	вакциновано по схемі:		Контроль число тварин не ліковані	Сроки заживлення ран		
	I	II		у вакцинованих		у невакцинованих
				по схемі I	по схемі II	у контрольній групі
№ 8	10	10	7	8 – 9	8 - 10	16 - 18
№ 145	8	8	5	9 - 11	8 – 9	16 - 19
№ 148	10	10	8	11 – 13	9 - 11	17 - 21

Згідно з отриманими даними, можна зробити висновок, що загоєння інфікованих ран у тварин контрольної (нелікованої) групи відбулося з тривалим збереженням запального процесу та струпу, із затримкою епітелізації та репаративної регенерації епідермального шару шкіри. У дослідних групах тварин, де використовувався метод аутовакцинотерапії, процес загоєння значно

інтенсифікувався. При цьому спостерігалася значно швидше утворення епітеліального шару та десквамація сформованого струпу, а через 30 днів спостерігалася майже повне загоєння ураженої ділянки, яка стала майже ідентичною шкірі здорових тварин.

Таблиця 2. Показники строків заживлення інфікованих ран у щурів при лікуванні аутовакцинами

Штам	Діапазон тривалості заживлення ран (у днях (M±m)) у мишей (n=30)		
	група I	група II	Нелікований контроль
штамом 8 / 30	10,5*±1,5	7,5*± 0,5	20±2
штамом 145/30	10,5*±2,5	9*±2	25±1
штамом 148/30	11,5*± 0,5	10*±2	27±1

Примітка :. * -дослідні групи статистично відрізняються від контролю (P<0.001)

Висновки

Проведені дослідження показали, що розвиток хронічного інфекційного процесу з наявністю первинного осередку інфекції, який досягається застосуванням розробленої моделі локального ураження, інфікованого культурою *P. aeruginosa*,

може слугувати для експериментальної оцінки ефективності аутовакцинотерапії.

Результати лікування експериментальних тварин (мишей та щурів) специфічними аутовакцинами підтвердили ефективність такої терапії при ранових формах синьогнійної інфекції. При цьому, строки заживлення ран у вакцинованих

тварин статистично достовірно скорочувались у 2 та більше разів, а якість загоєння ураженої ділянки шкіри була досить високою.

Апробована модель, що відтворює в експерименті ранову форму синьогнійної інфекції, може бути використаною при подальшому вивченні ефективності препаратів для загального та місцевого лікування, що особливо актуально у воєнний час

The effectiveness of autovaccine therapy for local lesions with *Pseudomonas aeruginosa* infection (experimental studies)

Svitlana Derkach, Valentina Dyachenko, Nadiya Skliar, Anatoliy Maryushchenko, Nataliya Kutsay

Pseudomonas infection has different clinical forms, different localization and severity of the specific process. Clinical approaches to the treatment of different categories of patients are somewhat different. In septic manifestations of infection, the use of antibiotic therapy is important, in the transition to a chronic process and in local lesions, the use of autovaccine therapy is possible. Technologies for the production of autovaccines were developed by us in previous years based on the use of the latest method of photodynamic inactivation of candidate bacteria. The **aim** of this study was to study the effectiveness of the use of autovaccine therapy for local wound lesions complicated by *Pseudomonas* infection. For this, first of all, a model of *Pseudomonas* infection of local lesions in laboratory animals was developed. To prolong the course of local infection, a solution of calcium chloride was used. After the administration of this drug, 0.2 ml of *pseudomonas* culture at a dose of 6 LD₅₀ was injected under the crust into the resulting area. The procedure was repeated after 24-48 hours. For experiments on laboratory animals, two autovaccine administration schemes were used: the first - intraperitoneally (twice 0.5 ml with an interval of 5 days); the second - subcutaneously (three times 0.2 ml with an interval of 3 days). The effectiveness of vaccine therapy was assessed by indicators of clinical manifestation of infection, wound healing time and survival compared with the control untreated group of animals. The experiments were conducted on rats and white outbred mice. Infection of skin wounds was carried out with strains of *Pseudomonas aeruginosa* freshly isolated from inpatients. The results of the studies showed that in the experimental groups of animals where the autovaccine therapy method was used, the healing process was significantly intensified. Wound healing time in vaccinated animals was reduced by two or more times compared to untreated animals, and the quality of healing of the affected skin area was quite high. At the same time, after 30 days, almost complete healing of the affected area was observed.

Conclusions: The obtained results of treatment of experimental animals with specific autovaccines

confirmed the effectiveness of such therapy in wound forms of *Pseudomonas aeruginosa* infection. The tested model, which reproduces the wound form of *Pseudomonas aeruginosa* infection in the experiment, can be used in further studies of the effectiveness of drugs for general and local treatment, which is especially relevant in war time.

Keywords: *Pseudomonas* infection, model local lesions, autovaccine therapy, immunisation schema

References

1. Fan N, Hu Y., Shen H., Liu S Profiling of pathogens Compositional and drug –resistance profiling of pathogens in patients with severe acute pancreatitis: a retrospective study. *BMC Gastroenterol*. 2020. 1;20(1):405. doi:10.1186/s12876-020-01563-x. PMID: 33261570.
2. Vincent J. L. Vaccine Development And Passive Immunization For *Pseudomonas aeruginosa* In Critically Ill Patients: A Clinical Update. *Future Microbiol*. 2014. 9(4). P. 457–63.
3. Derkach S., Kutsay N., Dyachenko V., Maryushchenko A., Promising directions for improving the fight against *Pseudomonas aeruginosa* infection: Proceeding of international scientific and practical conference, September 28-30.2023.Tokyo. 2023. C.48-52.
4. Method of obtaining a vaccine for the prevention and treatment of pseudomonosis: pat. 143248 Україна: МПК C12N1/04(2006.01). № u 2012908730; заявл. 19.07.2019; опубл. 27.07.2020, Бюл. № 14. 5 с.
5. Derkach S., Martynov A., Gorodnitskaya N., Kutsay N., Romanova O. (2022). Influence of photodynamically inactivated *Pseudomonas aeruginosa* vaccine on cytokine secretion by mouse dendritic cells. *Annals of Mechnikov's Institute*, (2), 51–54. <http://journals.urau.ua/ami/article/view/257143>.
6. Derkach S., Martynov A., Gorodnitskaya N., Kutsay N., Sklyar N., Method of obtaining autovaccine (AV) for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection (PAI) and prevention of nosocomial pseudomonosis: Medical and biological innovation. Information bulletin. Supplement to the Journal of the Academy of Medical Sciences of Ukraine. Kyiv, 2023. Issue 55. P. 40.
7. Derkach S., Kutsay N., Gorodnitskaya N., Sklyar N., Derkach S., Kutsay N., Gorodnitskaya N., Sklyar N., Protective properties of *Pseudomonas aeruginosa* autovaccine samples (2023). *Infectious diseases* 2023. No. 1. P.35-40.
8. Galapero J., Fernandes S., Carlos J. Peres et al. Exploring the impotence of mixed autogenous vaccines as a potential determinant of lung consolidation in lamb using Bayesian networks. *Preventive Veterinary Medicine*. 2019. T. 169. P.104693.
9. Yang Pang, Jiagi Bi, Jiagi Shi. Multidrug –resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections pose growing

- threat to health care-associated infection control in the hospitals of southern China: a case – control surveillance study. *Am J. Infect Control*. 2014. 42(12): 1308-11. Doi: 10.1016/ J.Ajic.2014.08.006. Epub 2014. Oct. 16. PMID: 25444305.
10. Priebe G.P., Goldberg J.B. Vaccines For *Pseudomonas aeruginosa*: A Long And Winding Road. *Expert Rev. Vaccines*. 2014. № 13(4). C. 507–19.
11. Dercach S., Martynov A., Romanova O . Indicators of post-vaccination humoral immunity during immunization with blue-red vaccines (experimental studies). *Analyzes of the Mechnikov Institute*. 2023.. № 3, C. 42-44. (www. Imiamn.org.ua/journal.html). DOI: 10.5281/ZENODO.8324848.
12. Derkach S.A., Gorodnitskaya N.I., Kutsay N.M., Sklyar N.I., Voronkina I.A. Modeling of *Pseudomonas aeruginosa* infection of local lesions in laboratory animals. *Practical wartime medicine*. Kyiv-Kharkiv. 2023. December 6-7, pp. 13-14.