

С. А. Деркач, Н. М. Куцай, Н. І. Скляр, І. А. Воронкіна, В. Ф. Дяченко

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ СИНЬОГНІЙНИХ АВТОВАКЦИН, ОТРИМАНИХ МОДИФІКОВАНИМ ФОТОДИНАМІЧНИМ СПОСОБОМ

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»

Метою дослідження є підвищення ефективності лікування білих мишей із синьогнійною інфекцією шляхом застосування автовакцин, отриманих із використанням методу фотодинамічної інактивації збудника.

Матеріали і методи. Експериментальні серії автовакцин отримували модифікованим фотодинамічним способом. Для дослідів були задіяні 150 білих безпородних мишей, масою 18-20 г. Для інфікування лабораторних тварин визначали LD50 штамів *P. aeruginosa*. Ефективність вакцинотерапії оцінювали шляхом порівняння показників виживання мишей у дослідній та контрольній групах.

Результати досліджень. В експерименті вивчено перспективність застосування автовакцин при лікуванні мишей, попередньо інфікованих гомологічним штамом *P. aeruginosa*. Отримані результати свідчать про високу ефективність вакцинотерапії інфікованих тварин, оскільки показники виживання в дослідній групі склали 71,8 %, тобто були у 3 рази вищі, порівняно з контрольною групою. Вакцинація у період клінічних проявів інфекції (на 3-5-й день після зараження) також була ефективною, оскільки кількість загинув тварин була достовірно меншою ($p < 0,05$). Більше того, навіть за відсутності повного одужання, лікування автовакциною суттєво подовжувало їх життя (до 20-30 днів) та зменшувало ступінь клінічних симптомів захворювання.

Висновок. Експериментальні дослідження засвідчили, що отримані розробленим способом синьогнійні автовакцини здатні забезпечити високу протективну та терапевтичну активність (у 3 рази більшу кількість тварин, що вижили), тому подальше вивчення особливостей автовакцинотерапії є актуальним і перспективним.

Ключові слова: синьогнійна інфекція, фотодинамічна інактивація збудника, протективність вакцин, автовакцинотерапія.

Гнійно-запальні захворювання, що викликаються синьогнійною паличкою, характеризуються тяжким ступенем, інтоксикацією, високою летальністю. Особливого значення набули ускладнення, зумовлені синьогнійною інфекцією, при пораненні та опіках в умовах воєнних дій, при ушпиталенні на тривалий час, при протезуванні тощо [1, 2]. Враховуючи високі показники антибіотикорезистентності штамів *P. aeruginosa*, актуальним і соціально та економічно обґрунтованим залишається розробка імунобіологічних засобів спрямованої дії для профілактики та лікування псевдомонозної інфекції [3].

У результаті широкої серологічної варіабельності циркулюючих штамів *P. aeruginosa* ефективність розроблених різними способами вакцин була досить незначною та вузькоспецифічною. Як свідчать дані літератури, антигенні комплекси можуть викликати синтез протективних антитіл, але, як правило, проти контрольних штамів, що були використані для отримання вакцин. Широкий захист навіть від інших підтипів одного і того ж серотипу достовірно не генерується [4, 5]. Це вказує на проблему специфічної імунопрофілактики синьогнійної інфекції, в основі якої лежить складність отримання ефективних мультиштамових вакцин.

Найперспективнішим напрямком лікування та профілактики синьогнійної інфекції є персоналізація вакцинації через технології виготовлення автовакцин [6–8]. Особливо перспективними можуть бути запропоновані способи отримання вакцин як для ефективного лікування конкретних хворих чи поранених, так і для виготовлення «локальних» вакцин із штамів, циркулюючих серед медичного персоналу та вилучених із різних об'єктів у лікарняних закладах, для профілактики спалахів захворювань та санації осередків внутрішньолікарняних інфекцій. Їх можна назвати «внутрішньошпитальними».

Такі вакцинні препарати можуть включати антигени декількох аналогічних збудників (штамів *P. aeruginosa* різних серогруп) або представників інших видів УПМ (при мікст-інфекції, при циркуляції у лікувальному за-

кладі серед хворих і носіїв кількох збудників нозокомі- альних інфекцій).

Ефективність вакцин значною мірою залежить від способу їх отримання, що включає здатність інактивації штамів кандидатів при максимальному збереженні специфічних антигенів.

У попередніх дослідженнях нами був розроблений та запатентований оригінальний спосіб отримання фаголізатних мультиштамових вакцин із застосуванням новітнього методу фотодинамічної інактивації бактерій [9].

Оскільки для виготовлення автовакцин спосіб знезараження має бути максимально спрощеним і гарантовано надійним, цей метод був нами модифікований [10].

Здатність отриманих запропонованим методом синьогнійних моновакцин впливати на формування специфічного імунітету, тобто володіти протективною активністю, була підтверджена нами в попередніх дослідженнях [11].

Завданням дослідження було визначення застосування автовакцин з метою вакцинотерапії в різні періоди попередньо інфікованих гомологічною культурою *P. aeruginosa* лабораторних тварин.

Метою дослідження є підвищення ефективності лікування білих мишей з синьогнійною інфекцією шляхом застосування автовакцин, отриманих з використанням методу фотодинамічної інактивації збудника.

Матеріали і методи

Вакцинні зразки готували із свіжовилучених від пораних і хворих на гнійно-запальні захворювання, які були ушпиталені до клінічних відділень та військового шпиталу у м. Харків (згідно з договорами про науково-практичне співробітництво).

Експерименти здійснили на 150 білих безпородних мишах. Визначення LD50 використаних штамів здійснювали загальноприйнятим методом. Визначали індекс ефективності вакцин (IE) – відношення LD50 дослідне до LD50 у контролі, ефективність вакцинотерапії – за показниками виживання у дослідній та контрольній групах.

Для отримання автовакцин була використана розроблена нами технологія, в основу якої покладено застосування свіжовилученого штаму синьогнійної палички, двох фотосенсибілізаторів ендogenousного походження – рибофлавіну (7, 8-диметил-10-рибітілоаллоксазин) та вікасолу (вітамін К) з послідовним опроміненням ультрафіолетом та світлом фотополімерної лампи [10]. Параметри використання фотосенсибілізаторів і режиму їх опромінення визначали експериментальним шляхом, ступінь знезараження вакцинних штамів – контрольними висівами з кожного вакцинного зразка на селективне середовище та внутрішньочеревним введенням білим мишам (біологічний контроль для виключення можливої реверсії їх ДНК).

Результати досліджень та їх обговорення

Протективну активність зразків автовакцин із штамів *P. aeruginosa*, вилучених із різних біотопів хворих, оцінювали у двох напрямках. По-перше, визначали їх імуногенність, оцінюючи профілактичну активність, а по-друге – можливість застосування вакцини для лікування вже інфікованих гомологічним штамом *P. aeruginosa* пацієнтів, тобто як автовакцинотерапію. У лабораторних умовах нами були отримані нові серії автовакцин із госпітальних штамів *P. aeruginosa*, вилучених із ранових виділень. В експерименті було показано, що нові серії вакцин, отримані модифікованим методом на основі сучасного способу фотодинамічної інактивації мікроорганізмів з використанням ендogenousних фотосенсибілізаторів, захищали лабораторних тварин від зараження *P. aeruginosa* з індексом ефективності 3-7.

Для вивчення перспективності застосування вакцин з метою автовакцинотерапії був поставлений наступний експеримент.

Лабораторних мишей було поділено на 2 групи:

I – дослідна, попередньо інфіковані гомологічною культурою *P. aeruginosa* (що дорівнювало 5 LD50), які в різні періоди після зараження (через 1, 3 та 5 діб) отримували дозу автовакцини (0,5 мл внутрішньочеревинно);

II – контрольна, інфіковані аналогічними дозами культури *P. aeruginosa*, яким вакцину не вводили.

Результати дослідження свідчать про високу ефективність вакцинотерапії інфікованих тварин, оскільки показники виживання в дослідній групі склали 71,8 %, тобто були у 3 рази вищі, порівняно з контрольною групою. Вакцинація у період клінічних проявів інфекції (на 3-5-й день після зараження) також була ефективною, оскільки кількість загиблих тварин була достовірно меншою ($p < 0,05$) (табл. 1).

У літературі є дані про особливості протективної активності синьогнійних вакцин, які зводяться до того, що вироблення імуноглобулінів не є ефективним показником, здатним надійно захищати від летальної інфекції *P. aeruginosa*. Тобто тільки антитіла не здатні достатньою мірою захистити організм від цього патогена. Необхідна стимуляція і клітинних механізмів адаптивного імунітету, що контролює імунні реакції на етапах розпізнавання чужорідних антигенів, їх визначення та знищення. Разом з тим, активація гуморальної ланки імунної системи доцільна [12]. Здійснені нами попередні дослідження впливу інактивованої розробленим способом синьогнійної автовакцини на деякі ланки імунної системи тварин засвідчили, що найважливішою частиною механізму дії бактерійних антигенів є посилення проліферації і функціональної активності ефекторних клітинних механізмів природженого та адаптивного імунітету [12, 13].

Показники протективної активності автовакцини, введеної дослідним тваринам, інфікованим гомологічним штамом *P. aeruginosa*

Група	Період введення вакцини після зараження через:			Всього загинуло		Загиблих тварин через 5 діб		Вижило	
	24 год	3 доби	5 діб	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
I (дослідна), n=60	n=20	n=20	n=20	17	28,3	10	16,7*	43	71,8*
II (контрольна), n=30	вакцина не вводилась			23	76,7	17	56,7	7	23,3

Примітка. * – достовірна різниця ($p < 0,05$) у групі вакцинованих тварин порівняно з контролем.

На сьогодні залишається нез'ясованим, який тип імунної відповіді необхідний для запобігання колонізації слизових оболонок або шкіри синьогнійною паличкою (профілактична імунізація), а який сприятиме швидкому і повному одужанню хворих на синьогнійну інфекцію (ефект автовакцинотерапії). Для з'ясування важливих питань у цьому напрямку необхідне вивчення ряду імунних показників, відпрацювання способів введення вакцин, інфікування гетерогенними штамми синьогнійної палички тощо. Тим не менше, отримані результати вже є достатньо позитивними.

Однією з перешкод до широкого впровадження автовакцинотерапії в клінічну практику є певні труднощі в отриманні вакцин із свіжовилучених штамів, їх очистка, контроль знезараження, перевірка токсичних або алергізувальних властивостей. Запропонований нами спосіб отримання вакцин дозволяє усунути ряд таких труднощів. Він селективно руйнує ДНК та РНК бактерій кандидатів без зміни антигенного складу корпускулярних антигенів, без застосування шкідливих речовин, забезпечуючи специфічну імуногенність за відсутності реактогенності імунопрепарату [10, 14, 15]. Слід зазначити, що при цьому у ролі фотосенсибілізаторів використані речовини (вітаміни В₂ та К), які природно є в організмі людини у результаті або синтезу самим організмом, або при використанні як продукту травлення. Такі фотосен-

сibiliзатори нетоксичні й не дають токсичних фотопродуктів після фотоопромінення, Тому при їх застосуванні зникає необхідність вилучення або очистки від залишків препарату, а вакцину можна безпосередньо вводити пацієнтам.

Розробка нового способу отримання вбитої, нешкідливої та високоефективної автовакцини на основі автоштамів (або локально циркулюючих актуальних штамів-збудників) може сприяти зниженню показників захворюваності, летальності, різних ускладнень при хронічному перебігу інфекцій та зменшенню внутрішньолікарняної циркуляції полірезистентних штамів.

Перспективним напрямком подальших досліджень може бути вивчення можливості використання такої вакцини як антигена для імунізації донорів з метою отримання специфічних імуноглобулінів для екстреного застосування тяжкохворим і пораненим, що є особливо актуальним у воєнний час.

Висновок

Експериментальні дослідження засвідчили, що отримані розробленим способом синьогнійні вакцини здатні забезпечити високу протективну (з індексом ефективності 3-7) та терапевтичну активність (близько 72 % тварин, що вижили), тому подальше вивчення особливостей автовакцинотерапії є актуальним і перспективним.

Література

- Peng, Y., Bi, J., Shi, J., Li, Y., Ye, X., Chen, X., & Yao, Z. (2014). 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. *American Journal of Infection Control*, 42(12), 1308-1311.
- Fan, N., Hu, Y., Shen, H., Liu, S. (2020). Profiling of pathogens: Compositional and drug-resistance profiling of pathogen patients with severe acute pancreatitis: a retrospective study. *BMC Gastroenterol.*, 1, 20(1), 405. DOI:10.1186/s12876-020-01563-x. PMID: 33261570.
- Galapero, J., Fernández, S., Pérez, C. J., Calle-Alonso, F., Rey, J., & Gómez, L. (2019). Exploring the importance of mixed autogenous vaccines as a potential determinant of lung consolidation in lambs using Bayesian networks. *Preventive Veterinary Medicine*, 169, 104693.
- Priebe, G. P., & Goldberg, J. B. (2014). Vaccines for *Pseudomonas aeruginosa*: a long and winding road. *Expert Review of Vaccines*, 13(4), 507-519.
- Vincent, J. L. (2014). Vaccine development and passive immunization for *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients: a clinical update. *Future Microbiology*, 9(4), 457-463.

6. Volosach, O. S. (2011). A clinical example of successful treatment of a mixed infection with an autovaccine that complicated the course of chronic furunculosis. *Journal of GrSMU*, 1(33), 12-14.

7. Daniel, G. V., Laura, S. V., Jose, B. P., Enrique, C. A., Enrique, C. G., Juan, G. G., & Mateo, P. M. (2014). Autovaccines for chronic urinary tract infections; ten years follow-up experience. *American Journal of Life Sciences*, 2(6-3), 13-17.

8. Giedrys-Kalemba, S., Czernomysy-Furowicz, D., Fijałkowski, K., & Jursa-Kulesza, J. (2018). Autovaccines in individual therapy of staphylococcal infections. In *Pet-To-Man Travelling Staphylococci* (pp. 253-264). Academic Press.

9. The method of obtaining a vaccine for the prevention and treatment of pseudomonosis: pat. 143248 Ukraine: IPC C12N1/04 (2006.01). No. u 2012908730; statement 19.07.2019; published 07/27/2020, 14, 5 [in Ukrainian].

10. Derkach, S. A., Martynov, A. V., Horodnytska, N. I., Kutsai, N. M., Sklyar, N. I. (2023). The method of obtaining an autovaccine (AV) for the treatment of pyogenic infection (SGI) and the prevention of nosocomial pseudomonosis: a medical and biological innovation. *Newsletter. Supplement to the Journal of the Academy of Medical Sciences of Ukraine*, 55, 40 [in Ukrainian].

11. Derkach, S. A., Kutsai, N. M., Horodnytska, N. I., Sklyar, N. I. (2023). Protective properties of samples of *Pseudomonas aeruginosa*

autovaccine. *Infektsiyni khvoroby – Infectious Diseases*, 1, 111, 35-40 [in Ukrainian].

12. Derkach, S. A., Horodnytska, N. I., Romanova, O. A., Gabysheva, L. S. (2022). Effect of photoinactivated *Pseudomonas aeruginosa* 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. 37-44. URL: <http://sci-conf.com.ua>.

13. Dercach, 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 [in Ukrainian].

14. Meerovich, G. A., Tiganova, I. G., Makarova, E. A., Meerovich, I. G., Romanova, M., Tolordova, E. R., ... & Gonchukov, S. A. (2016, February). Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 691, No. 1, p. 012011). IOP Publishing.

15. Bäumlner, W., Regensburger, J., Knak, A., Felgenträger, A., & Maisch, T. (2012). UVA and endogenous photosensitizers—the detection of singlet oxygen by its luminescence. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(1), 107-117.

EXPERIMENTAL STUDY OF P. AERUGINOSA AUTOVACCINES RECEIVED BY A MODIFIED PHOTODYNAMIC METHOD

S. A. Derkach, N. M. Kutsay, N. I. Sklyar, I. A. Voronkina,
V. F. Dyachenko

I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology of
NAMS of Ukraine

SUMMARY. The purpose of this research is usage to improve the effectiveness of treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection by stagnation of autovaccines, withdrawn from and the method of photodynamic inactivation of the alarm system.

Materials and methods. Experimental series of autovaccines were prepared using a modified photodynamic method. For further investigations, 150 white outbred mice were used, weighing 18–20 g. For infecting laboratory animals, an LD50 strains of R a was prescribed. The effectiveness of vaccine therapy was determined by equal rates of target survival in the last and control groups.

Results. The results are being followed. The experiment showed the prospects of stagnation of autovaccines when previously infected with a homologous strain of P. The results obtained indicate the high effectiveness of vaccine therapy for infected animals, based on the survival rate in up to the last group accumulated 71.8 %,

which was 3 times higher than that of the control group. Vaccination during the period of clinical manifestations of infection (3–5 days after infection) was also effective, but the number of dead animals was significantly smaller ($p < 0.05$). Moreover, in the absence of regular clothing, treatment with autovaccine significantly prolonged their lives (up to 20–30 days) and changed the stage of manifestation of clinical symptoms of illness.

Conclusion. Experimental studies have shown that the use of isolated methods for synonymous autovaccines can provide high protective and therapeutic activity (three times the number of surviving animals), so it is better to study the specific characteristics of the autovaccines. accinoterapies are relevant and promising.

Key words: blue purulent infection; photodynamic inactivation of the bud; vaccine protection; autovaccination therapy.

Відомості про авторів:

Деркач Світлана Андріївна – канд. мед. наук, наук. співроб., завідувачка лабораторії анаеробних інфекцій Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; e-mail: svetlanaderkach1111@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8534-1431>

Куцай Наталія Михайлівна – молодший науковий співробітник лабораторії анаеробних інфекцій Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Меч-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

никова Національної академії медичних наук України»; e-mail: natachakutsay@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9187-3701>

Скляр Надія Іванівна – канд. мед. наук, наук. співроб., заступниця директора з наукової роботи Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; e-mail: sklyarimi@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8534-1431>

Воронкіна Ірина Анатоліївна – канд. мед. наук, пров. наук. співроб. лабораторії анаеробних інфекцій Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; e-mail: voronkina2008@ukr.net

Дяченко Валентина Федорівна – канд. біол. наук, старш. наук. співроб., пров. наук. співроб. лабораторії анаеробних інфекцій Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; e-mail: lab.anaerob@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8534-1431>

Information about the authors:

Derkach S. A. – PhD, Senior Research Fellow, of the Laboratory of Anaerobic Infections I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of

Medical Sciences of Ukraine; e-mail: svetlanaderkach1111@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8534-1431>

Kutsay N. M. – researcher of the Laboratory of Anaerobic Infections I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine; e-mail: natachakutsay@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9187-3701>

Sklyar N. I. – a Deputy Director for scientific work, I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine; e-mail: sklyarimi@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8534-1431>

Voronkina I. A. – leading researcher of the Laboratory of Anaerobic Infections of the State I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine; e-mail: voronkina2008@ukr.net

Dyachenko V. F. – PhD (Biology), leading researcher of the Laboratory of Anaerobic Infections of the State Institution I. Mechnikov of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine; e-mail: lab.anaerob@ukr.net

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8534-1431>

Конфлікт інтересів немає.

Authors have no conflict of interest to declare

Отримано 10.03.2024 р.