

2. Ванін А. Ф. Оксид азота в біології: історія, стан і перспективи досліджень / А.Ф. Ванін // Біохімія. – 1998. – Т. 63, № 7. – с. 867 - 869.
3. Кваша О. И. Терапія оксидом азота в газовому потоці в офтальмотравматології. Автореф. дис...докт. мед. н. 14.00.08 – М., 2007. – 27с.
4. Мойбенко О. О. Роль оксиду азота в рефлекторній саморегуляції кровообігу / О.О. Мойбенко, В.Б. Павлюченко, В.В. Даценко // Досягнення біології та медицини. – 2003. – №1. – с. 72-79.
5. Оксид азота – новий фізіологічний месенджер: можлива роль при патології ЦНС / К.С. Раевський // Бюл. експерим. біол. і мед. – 1997. – № 5. – с. 484 - 490.
6. Применение экзогенного оксида азота в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии / Е.Г. Чирикова, А.М. Шулутоко, А.Б. Шехтер [и др.] // Рос. мед. журн. – 2003. – № 3. – с.14 - 16.
7. Сагач В. Ф. Нові підходи до корекції серцево – судинних порушень, що супроводжуються дисфункцією ендотелію / В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – Т. 48, № 4. – с.86 - 87.
8. Экспериментально – клиническое обоснование плазмодинамической терапии ран оксидом азота / А.Б. Шехтер, Р.К. Кабисов, А.В. Пекшев [и др.] // Бюл. експерим. біол. і мед. – 1998. – Т. 126, № 8. с. 210 -215.

Резюме

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ГЛУТАРГИНА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ
ПОВРЕЖДЕНИЙ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА
Горлачева П.М., Непорада К.С., Насонов П.И.**

На основе морфологических исследований доказана экспериментальная эффективность применения прекурсора NO глутаргина для коррекции травматических повреждений роговицы глаза.

Ключевые слова: глутаргин, травма роговицы глаза.
Стаття надійшла 15.04.10

**EXPERIMENTAL EFFICACY OF
GLUTARGINE FOR THE CORRECTION OF
EYE CORNEA INJURIES.
Gorlachova P.M., Neporada K.S., Nasonov P.I.**

Under the base of morphological reseaches the experimental efficacy of precursor NO glutargine application for the correction of traumatic injuries of eye cornea is proved.

Key words: glutargine, eye cornea injury.

УДК 579.841.1:579.253.2

Д. У. Горлачова
ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України"

**ВИВЧЕННЯ ПРОТЕКТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АЛЬГІНОПРОТЕЇДНОГО АНТИГЕНУ P.
AERUGINOSA 66-16**

В результаті досліджень протективних властивостей альгінопротеїдного антигену P. aeruginosa 66-16 було встановлено, що він забезпечує захист від інфікування не тільки гомологічним штамом P. aeruginosa ІГН 66-16, але й від зараження гетерологічними штамми P. aeruginosa за рахунок наявності в складі альгінопротеїдного антигену консервативного білку-порину Opr F та його рецептору Fpr A.

Ключові слова: синьогнійна паличка, альгінопротеїдні антигени, білки-порини, протективні властивості.

Робота виконана відповідно до комплексної наукової програми ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України": "Ацільовані похідні білків та полісахаридів антигену синьогнійної палички, розробка на їх основі вакцин" (№ державної реєстрації 0106U003265);

Пороутворюючі білки давно привертають увагу дослідників як мультифункціональні компоненти зовнішньої мембрани бактеріальних клітин, що грають важливу роль у взаєминах паразита з організмом господаря. Здатність поринів індукувати утворення протективних, бактерицидних і опсонізуючих антитіл може бути використана при конструюванні вакцинних препаратів і при діагностиці інфекційних захворювань. На сучасному етапі розвитку імунології та вакцино-профілактики основним критерієм при виборі антигену для вакцинації стало забезпечення можливості отримання видоспецифічного імунітету, а також ефективного захисту від аерогенного інфікування [1]. Білки зовнішньої мембрани бактерій як конструктивні компоненти вакцинних препаратів мають значні переваги в порівнянні з ліпополісахаридами.

По-перше, вони не токсичні, по-друге, вони, як правило, є видоспецифічними антигенами [2, 3, 4]. У зв'язку з цим препарати, створені на основі білків зовнішньої мембрани бактерій, і перш за все поринів, можуть захищати від інфекції, що викликається усіма типами даного виду мікроорганізму. Ці білки являють собою специфічну групу інтегральних мембранних білків з незвичайною просторовою структурою. Особливості структури і поверхнева локалізація в клітині обумовлюють участь поринів у здійсненні динамічного зв'язку між бактеріями й навко- лишнім середовищем. У процесі прояву своєї мультифункціональної активності ці білки включаються у підтримку структурної цілісності клітини, зв'язування різних речовин, адгезію до інших клітин і регуляцію транспорту як поживних речовин, так і бактерицидних агентів. Порини — білки клітинної стінки грамнегативних бактерій, вони утворюють наповнені водою пори (канали) і сприяють неспецифічному проходженню через зовнішню мембрану сполук з відносно невисокою молекулярною масою [5]. Видоспецифічність імунної відповіді відзначали практично всі дослідники [5]. Це обумовлено консервативністю структури поринових білків [5]. Більшість збудників інфекційних хвороб тварин, щодо яких немає ефективних вакцин (збудники гемофілеза, псевдомоназа, псевдотуберкулеза та інші), серологічно неоднорідні, тому використання пороутворюючих білків бактерій для імунізації дозволить уникнути приготування вакцинних препаратів з комбінації антигенів, які індукують штамоспецифічну імунну відповідь (вбиті клітини, ЛПС, джгутики, альгінат). На початок досліджень протективної здатності пороутворюючого білку *P. aeruginosa* (білку F) в 1983 р. було встановлено наступне: антипсевдомонадні вакцини на основі ЛПС є реактогенними і дозволяють отримувати захисний ефект тільки відносно штаму того ж серотипу, з якого ЛПС був виділений; у хворих з псевдомоназним фіброзом легенів переважають антитіла до білку F; білок F є основним білком зовнішньої мембрани, він консервативний і антигенно пов'язаний зі всіма серотипами *P. aeruginosa*. Грунтуючись на цих даних, Н. Gilleland і співавт. [6, 7] провели серію експериментів з вивчення протективної дії білку F. Було показано, що при двократній імунізації мишей білком F в дозі 10 мкг на тварину з подальшим інфікуванням 3 LD₅₀ збудника синьогнійної інфекції відсоток тварин, що вижили, складав від 90 до 100 залежно від штаму, вибраного для зараження. При тій же дозі інфікування виживало до 90% мишей, яким вводили імунну кролячу сироватку. Доведена можливість отримання протективного ефекту при хронічній легеневої інфекції кролів, яка є моделлю легеневого фіброзу у людей. Імунізація білком F захищала кролів від усіх імунотипів *P. aeruginosa*, які були в розпорядженні авторів. F-білок стимулював утворення IgG та IgM, що реагують з клітинними стінками всіх штамів *P. aeruginosa*.

Переваги білку F як "кандидата" у вакцини для профілактики хронічної псевдомонадної легеневої інфекції Н. Gilleland і співавтори обґрунтовують тим, що в результаті переходу шерохуватої форми *P. aeruginosa* в гладку при колонізації легеневої тканини збудник втрачає O-антиген, який стимулює специфічний імунітет, і починає продукувати альгінат (головний компонент мукоїдного секрету). Разом з тим антитіла до білку F (OprF) надають бактерицидну дію не тільки на шерохувату форму збудника, але й після його переходу в гладку. Інший "кандидат" для використання в якості антигену у складі вакцини – альгінат – не мав достатньої захисної дії в аналогічних експериментах. Рецептором цього F білку є рецептор півердину [6], який має назву ферріседирофор FрvA. Його мутації достатньо гарно вивчені для ствердження про консервативність структури та перспективність використання для розробки вакцин [7]. Обидва білки є мономерними фрагментами глікопротеїдного комплексу клітинної мембрани з середньою молекулярною масою 1,5 мДа. Фракція масою 1,5 мДа має характерну ознаку – вона флуоресціює та на колонці виділяється однією з перших, не містить фрагментів токсину та не є реактогенною. Обробка цього глікопротеїду денатураторами (меркаптоетанолом та додецилсульфатом натрію) приводить до утворення білків FрvA і OprF та чистого альгінату [8]. В цій же роботі показано, що на відміну від антитіл проти екзотоксину A, антитіла проти OprF мають бактерицидні властивості. На основі плазмід, що кодує OprF в США проходить третю фазу клінічних випробувань генна вакцина для профілактики синьогнійної інфекції. Картування різних мутантів білку OprF показало консервативність більшості його пептидних епітопів та збереження стабільності структури протягом часу зберігання та умов культивування, незважаючи на різні імунотипи O-антигену [9,11].

Метою роботи було дослідження протективних властивостей альгінопротеїдного антигену *P. aeruginosa* 66-16, що містить консервативні білки-порини OprF та FрvA, як кандидату у вакцини для профілактики синьогнійної інфекції.

Матеріал та методи дослідження. Об'єктами дослідження були штами мікроорганізмів *P. aeruginosa*: 1) промисловий штам для виробництва вакцин – *P. aeruginosa* ПГН 66-16; 2) клінічні

штами, які виділені від хворих з хірургічними втручаннями - *P. aeruginosa* 15, *P. aeruginosa* 25, *P. aeruginosa* 53. Штами зберігались в напіврідкому середовищі. Життєздатність клітин підтримували методом пересівів на тверде поживне середовище – агар Мюллера-Хінтона (АМХ).

Нами було досліджено протективні властивості найбільш імуногенного антигену зі штаму *P. aeruginosa* 66-16 (перша фракція водорозчинного альгінопротеїдного антигену зі ступенем модифікації 3%). В досліді використовували 130 білих неімбренних мишей, з яких 10 залишалися в контрольній групі (невакциновані, неінфіковані тварини, яких утримували на раціоні віварію в той же час, коли проводили дослідження). Вакцину вводили однократно в дозі 0,1 мл з концентрацією білку 0,02 мг/мл (розрахунки проводили за методом Кербера з урахуванням попередніх досліджень імуногенності). Статистичну обробку отриманих результатів проводили згідно статистичних методів за критерієм Стьюдента-Фішера у бактеріологічних дослідженнях [10].

Результати дослідження та їх обговорення. У таблиці 1 представлені результати дослідження протективних властивостей вакцини-кандидату зі штаму *P. aeruginosa* 66-16 (перша фракція водорозчинного альгінопротеїдного антигену зі ступенем модифікації 3%).

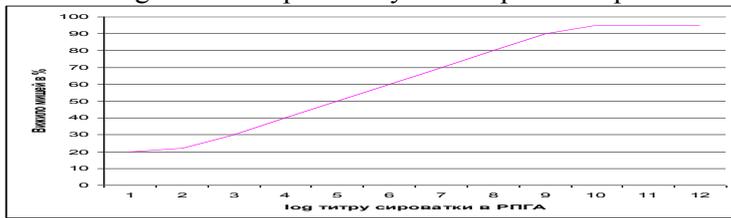
Таблиця 1

Протективні властивості водорозчинного антигену синьо гнійної палички, хімічно модифікованого на 3%

Штами <i>P. aeruginosa</i> , які використовували для внутрішньочеревиного інфікування тварин	Дослід*		Контроль **	
	вижило	%	вижило	%
<i>P. aeruginosa</i> № 66-16 (O-5)	9	90	3	30
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 (O-2, імунотип 3 за Fisher-Devlin)	9	90	3	30
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (O-11, імунотип 2 за Fisher-Devlin)	8	80	5	50
<i>P. aeruginosa</i> 25***	9	90	4	40
<i>P. aeruginosa</i> 53***	10	100	2	20
<i>P. aeruginosa</i> 15***	10	100	3	30

Примітки: * - тварин вакцинували антигеном, отриманим зі штаму *P. aeruginosa* 66-16, а потім інфікували відповідним штамом синьогнійної палички; ** - тварин інфікували відповідним штамом синьогнійної палички; *** - клінічні штами *P. aeruginosa*, що відрізняються за фаготипом, плазмідним профілем і антибіотикочутливістю (Порт О. В., 2006 р.) [16].

Отже, модифікований антиген захищав від 80 до 100 % тварин, в т.ч. інфікованих актуальними клінічними штамми. Слід звернути увагу на той факт, що серед тварин, інфікованих актуальними клінічними штамми синьогнійної палички, виживало не більше 30 % тварин. Це свідчить про відсутність антигенної штамоспецифічності щодо протективних властивостей препарату та про перспективність застосування модифікованого на 3% від маси білку альгінопротеїдного антигену у подальшій розробці вакцини для профілактики псевдомонозів, викликаних в т.ч. клінічними штамми синьогнійної палички. Для з'ясування ролі виділеного альгінопротеїдного антигену клітинної стінки синьогнійної палички, що містить білок F і його рецептор (Org F і Fpv A відповідно) була вивчена залежність між протективними властивостями імунної сироватки та рівнем антитіл до цього антигену (рис.1). Були поставлені досліди по захисту мишей імунною сироваткою від введення летальної дози мікробних тіл. Титр антитіл у сироватці був визначений у РПГА з альгінопротеїдним антигеном клітинної стінки *P. aeruginosa*. Контролем служила сироватка крові неімунізованих антигеном тварин.



$z=0,91$ при $p<0,05$

Рис. 1. Залежність між титром антитіл до альгінопротеїдного антигену клітинної стінки синьогнійної палички та протективними властивостями імунної сироватки

Як видно з представлених на малюнку даних, спостерігалася пряма залежність між рівнем аглютининів до альгінопротеїдного антигену клітинної стінки синьогнійної палички і протективною активністю імунної сироватки (коефіцієнт кореляції $z = 0,91$ при $p < 0,05$). Високий ступінь кореляції цих показників дає можливість зробити висновок про те, що виділений альгінопротеїдний антиген клітинної стінки синьогнійної палички, що містить білок Org F і його рецептор FpvA, є протективним антигеном. Виявлена протективна активність альгінопротеїдного антигену клітинної стінки синьогнійної палички дозволяє зробити висновок, що з присутністю цього антигену у препараті пов'язана здатність останнього захищати організм тварини не тільки від зараження гомологічними штамом *P. aeruginosa* 66-16, а й від інфікування гетерологічними штамми синьо- гнійної палички.

Широкий спектр антигенної активності виділених білків (Opr F та Fpv A) є основою для створення на їх основі специфічних препаратів для профілактики синьогнійної інфекції.

Висновки

1. Підтверджено протективні властивості ацильованого на 3% від маси білку альгінопротеїдного антигену першої фракції зі штаму *P. aeruginosa* 66-16 по відношенню до *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, актуальних клінічних штамів *P. aeruginosa* 25, *P. aeruginosa* 53, *P. aeruginosa* 15, що відрізнялися один від одного за фаготипом, плазмідним профілем, антибіотикорезистентністю.
2. Ступінь захисту тварин варіювала від 80 до 100% при 70% смертності невакцинованих тварин.

Перспективи подальших досліджень в даному напрямку. З огляду на більш високу імуногенність поринів у порівнянні з іншими антигенами бактеріальних клітин, а також їх здатність викликати видоспецифічний імунітет, розробники вакцин повинні прагнути до максимального очищення пороутворюючих білків від фрагментів капсульного полімеру, нуклеїнових кислот, інших мембранних білків і ліпополісахаридного комплексу. Однак повністю видаляти полісахариди з препарату не потрібно, так як вони в слідовій кількості стабілізують третинну і четвертинну структуру порину.

Література

1. Супотницький М.В. Эффективное патентование средств специфической профилактики инфекционных заболеваний // Биотехнология. – 1997. № 9—10. С. 56—79.
2. Антигенные свойства поринов наружной мембраны рода иерсиний / Новикова О.Д., Вострикова О.П., Хоменко В.А. та інш.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1996. – № 6. – С. 657—660.
3. Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. Биологические свойства эндотоксинов грамотрицательных бактерий // Успехи соврем. биологии. – 1980. – Т. 90. – Вып. 1(4). – С. 62—79.
4. Major proteins of Escherichia coli outer cell envelop membrane. Interaction of protein II with lipopolisaccharide / Schweizer M., Hindennach I., Garten W. [at all.] // Eur. J. Biochem. – 1978. – Vol. 82. – № 1. – P. 211—217.
5. Новикова О. Д. Автореф. дис. ...канд. биол. наук.— Владивосток. 1986.
6. The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 angstroms resolution / D. Cobessi, H. Celia, N. Folschweiller [at all.] // J. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 347. – P.121—134.
7. Cornelis P. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. / P. Cornelis, S. Matthijs // Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 4. – P. 787—798.
8. Gilleland H. E. Vaccine efficiencies of elastase, exotoxin A, and outer membrane protein F in preventing chronic pulmonary infection by *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model / H. E. Gilleland, L. B. Gilleland, M. R. Fowler // J. Med. Microbiol. – 1993. –Vol. 38. – P. 79—86.
9. Rawling E. G. Epitope Mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* Major Outer Membrane Porin Protein OprF / E. G. Rawling, N. L. Martin, R. W. Hancock // Infection and immunity. – 1995. – Vol. 63. – P. 38—42.
10. Ашмарин В. Математические методы в биологии. – М.: Мир. – 1964. – С. 203.
11. Порт О. В. Адгезивні та колонізаційні властивості клінічно значущих штамів *Pseudomonas aeruginosa*: дис... канд. мед. наук: 03.00.07 / Порт Олена Валеріївна. — Х., 2006. — 179 с.

Реферати

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ АЛЬГИНОПРОТЕИДНОГО АНТИГЕНА *P. AERUGINOSA* 66-16 Городницкая Н.И.

В результате исследований протективных свойств альгинопротеидного антигена *P. aeruginosa* 66-16 было установлено, что он способен защищать от инфицирования не только гомологическим штаммом *P. aeruginosa* ИГН 66-16, но и от заражения гетерологическими штаммами *P. aeruginosa* за счет наличия в составе альгинопротеидного антигена консервативного белка-порина Opr F и его рецептора Fpv A.

Ключевые слова: синегнойная палочка, альгинопротеидные антигены, белки-порины, протективные свойства.

Стаття надійшла 11.04.10

STUDY OF THE PROTECTIVE PROPERTIES OF ALGINOPROTEIN ANTIGEN OF *P.* *AERUGINOSA* 66-16 Gorodnitskaya N.I.

As a result of researches of the protective properties of alginoprotein antigen of *P. aeruginosa* 66-16 it was proved that it protects of infection not only homologous strain of *P. aeruginosa* 66-16, but it also protects of infection heterologous strains of *P. aeruginosa* due to the presence of alginoprotein antigen conservative protein porins Opr F and its receptor Fpv A.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, alginoprotein antigen, protein porins, the protective properties.