

DOI: 10.26693/jmbs02.03.007

УДК 615.371:579.871.1:576.524:616-097

Єлисеєва І. В.¹, Бабич Є. М.¹, Білозерський В. І.¹, Ждамарова Л. А.¹,
Колпак С. А.¹, Гурін О. В.², Забеліна І. А.², Коваленко О. І.³

ВИВЧЕННЯ АДГЕЗИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОВЕРХНЕВИХ АНТИГЕНІВ *S. DIPHTHERIAE*, ОДЕРЖАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ КАСКАДНОЇ ДЕЗІНТЕГРАЦІЇ МІКРОБНИХ КЛІТИН РІЗНИМИ ФІЗИЧНИМИ ФАКТОРАМИ

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України», Харків

²Харківський Національний Університет ім. В. Н. Каразіна

³Інститут радіофізики і електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, Харків

babych_em@ukr.net

Стаття присвячена розробці вакцин нового покоління проти маніфестного прояву та персистуючої форми дифтерійної інфекції на основі виділення нативних антигенних комплексів дифтерії за допомогою каскадної дезінтеграції із застосуванням фізичних чинників. Метою дослідження стало визначення оптимальних режимів каскадної дезінтеграції мікробних клітин *S. diphtheriae* на основі вивчення впливу одержаних антигенних препаратів на адгезивні властивості тест-штаму *S. diphtheriae*. Мікробну суспензію музейного штаму *S. diphtheriae var. gravis, tox+*, піддавали обробці моно- та комбінованими фізичними факторами у різних режимах опромінення, а саме: ультразвуком середньої частоти, вузькосмуговим електромагнітним випроміненням у надзвичайно високочастотному діапазоні, лазерним опроміненням у терагерцовому та червоному оптичному діапазоні. Одержані дезінтеграти центрифугували, відокремлювали супернатанти та додавали їх до формалінованих еритроцитів людини, після експозиції вивчали адгезивні властивості тест-штаму *S. diphtheriae* за відомим способом. Майже усі антигенні препарати в тій чи іншій підвищували адгезивні властивості коринебактерій. Найбільш ефективними виявилися ЕМВ НЗВЧ (42,2 ГГц), терагерцовий лазер і комбінація ультразвуку з терагерцовим лазером: індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ) підвищився у 1,6-1,7 рази. Менш за все вплинули на адгезивну активність дифтерійної культури антигенні препарати, одержані за допомогою ЕМВ НЗВЧ (61 ГГц) у поєднанні з ультразвуком або гелій-неоновим лазером: ІАМ, відповідно, відрізнявся від контрольного зразку лише на 1,6 % і 0,7 %. Поєднання ультразвуку з гелій-неоновим лазером обумовило навіть зниження індексу адгезивності мікроорганізмів на 7,1 %. Значна різниця у вмісті білку у досліджуваних бактеріальних антигенних препаратах, одержаних при дезінтеграції мікробних клітин ЕМВ НЗВЧ і УЗ, підтверджують, що різні фізичні фактори по-різному впливають на поверхневі структури бактеріальних клітин коринебактерій. Одержані антигенні препарати є перспективними у якості антиколонізаційного фактору для *S. diphtheriae* для використання у складі комбінованих дифтерійних вакцин проти бактеріоносійства дифтерійної інфекції.

Ключові слова: *S. diphtheriae*, патогенасоційовані молекулярні структури, дезінтеграція, ультразвук, електромагнітне випромінення надзвичайно високої частоти, лазерне випромінення, дифтерійна вакцина.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Стаття є фрагментом НДР «Визначити вплив кашлюково-дифтерійних антигенів на клітинно-опосередкований імунітет та обгрунтувати концептуальні положення створення вакцин у форсуючому режимі», № держ. реєстрації 0117U002276.

Вступ. Наукове дослідження присвячене вирішенню актуальної проблеми охорони здоров'я – розробці вакцин нового покоління проти маніфестного прояву та персистуючої форми дифтерійної інфекції на основі виділення нативних антигенних комплексів дифтерії за допомогою каскадної дезінтеграції із застосуванням фізичних факторів.

Експериментальне обґрунтування каскадної фізичної технології одержання поверхневих структур стінок мікробних клітин збудників дифтерії дозволить одержувати нативні патогенасоційовані молекулярні комплекси, що відкриє перспективу стимулювати основні ланки природженого імунітету, ефективніше впливати на Toll-подібні рецептори імунних клітин. Одержані нативні поверхневі молекулярні комплекси в якості біологічних платформ нових комбінованих дифтерійних вакцин спрямовані на стимуляцію окремих ланок неспецифічної резистентності та клітинно-опосередковану адаптивну імунну відповідь. Значимість вивчення бактеріальних дифтерійних антигенів і їх застосування для вирішення проблеми бактеріоносійства дифтерії та перешкоджання циркуляції збудника серед населення акцентується рядом дослідників [1, 2, 9, 10]. В літературі висвітлені результати експериментів в напрямку розробки кандидат-вакцин комплексної дії як проти захворювання, так і бактеріоносійства на основі поверхневих структур патогенних коринебактерій у поєднанні з дифтерійним анатоксином [3-7].

Мета дослідження. Визначення оптимальних режимів каскадної дезінтеграції мікробних клітин *C.*

diphtheriae за допомогою різних фізичних факторів на основі вивчення впливу одержаних антигенних препаратів на адгезивні властивості тест-штаму *C. diphtheriae*.

Об'єкти дослідження. Музейна культура *C. diphtheriae*, var. *gravis*, tox+, № 255, нативні поверхневі антигени мікробних клітин *C. diphtheriae*, нативний очищений дифтерійний анатоксин, вузькосмугове електромагнітне випромінювання надзвичайно високої частоти (ЕМВ НЗВЧ), ультразвук середньої частоти (УЗ), лазерне випромінювання у червоному (He-Ne) та терагерцовому (тераГц) діапазонах.

Методи дослідження. Експериментальні антигенні препарати одержували наступним чином: нарощували мікробну масу культури музейного штаму *C. diphtheriae*, відмивали її від поживного середовища, стандартизували оптичну щільність мікробної суспензії, розподіляли на однакові за об'ємом зразки, піддавали їх дії фізичних факторів у різних режимах та комбінаціях (всього досліджено 15 режимів дезінтеграції мікробних клітин), відокремлювали супернатанти шляхом центрифугування, перевіряли одержані препарати на стерильність, після експозиції формалінізованих еритроцитів людини з досліджуваними антигенними препаратами вивчали адгезивні властивості тест-штаму *C. diphtheriae* за відомим способом [8].

Результати досліджень та їх обговорення. Проведені серії дослідів дозволили охарактеризувати одержані експериментальні препарати за їх впливом на адгезію тест-штаму *C. diphtheriae* (табл. 1).

Таблиця 1 – Результати вивчення впливу антигенних препаратів *C. diphtheriae*, одержаних за допомогою каскадної дезінтеграції мікробних клітин різними фізичними факторами на адгезію тест-штаму *C. diphtheriae*

№№ пп	Фізичний фактор, час опромінення	Показники адгезії		
		СПА	КА	IAM
«К»	Екстракція фіз. розчином	2,6±0,01	62±0,3	4,1±0,02
2	УЗ № 1	3,5±0,02	74±0,2	4,8±0,015
3	УЗ № 2	4,7±0,025	82±0,4	5,7±0,03
4	ЕМВ НЗВЧ 61 ГГц	4,5±0,03	82±0,35	5,5±0,04
5	ЕМВ НЗВЧ 42,2 ГГц	5,0±0,02	78±0,5	6,4±0,01
6	ЕМВ НЗВЧ 61ГГц + 42,2 ГГц	4,0±0,02	76±0,3	5,2±0,02
7	Лазер He-Ne № 1	4,7±0,03	84±0,1	5,6±0,02
8	Лазер He-Ne № 2	2,7±0,01	62±0,3	4,4±0,015
9	Лазер тераГц	5,7±0,01	86±0,2	6,6±0,02
10	Лазер He-Ne + лазер тераГц	4,5±0,02	84±0,1	5,3±0,01
11	УЗ + лазер He-Ne	2,8±0,01	74±0,4	3,8±0,02
12	УЗ + лазер тераГц	6,0±0,25	86±0,3	7,0±0,03
13	УЗ + ЕМВ НЗВЧ 61 ГГц	3,4±0,03	82±0,2	4,2±0,02
14	УЗ + ЕМВ НЗВЧ 42,2 ГГц	3,6±0,02	78±0,3	4,6±0,01
15	He-Ne № 1 + ЕМВ НЗВЧ 61 ГГц	3,1±0,01	74±0,4	4,2±0,015
16	He-Ne № 2 + ЕМВ НЗВЧ 42,2ГГц	3,9±0,01	84±0,2	4,7±0,02

Таблиця 2 – Результати біохімічних досліджень дифтерійних бактеріальних антигенних препаратів, одержаних за допомогою різних фізичних факторів

Фізичний фактор	Оптична щільність суспензії, КУО/мл	Концентрація білку, мг/мл	Гліцерин тейхоєва кислота, мг/мл	Рибітол тейхоєва кислота, мг/мл
ЕМВ НЗВЧ	14 млрд.	3,6	0,062	0,034
УЗ	10 млрд.	0,594	0,054	0,024
Різниця	- 29 %	- 6,1 р.	- 13 %	- 29 %

Як видно з **таблиці 1**, найбільш ефективними факторами щодо підвищення адгезивних властивостей тест-штаму *C. diphtheriae* виявилися ЕМВ НЗВЧ (42,2 ГГц), терагерцовий лазер і комбінація ультразвуку з терагерцовим лазером: індекс адгезивності мікроорганізмів підвищився, відповідно, на 55,2 %, 59,4 % та 69,5 %. Такі результати свідчать про те, що експериментальні бактеріальні антигенні препарати, одержані з біомаси музейної культури *C. diphtheriae var. gravis, tox+*, у різних режимах дезінтеграції фізичними факторами містять речовини, підвищуючі адгезивні властивості дифтерійної культури.

Менш за все вплинули на адгезивну активність дифтерійної культури антигенні препарати, одержані за допомогою ЕМВ НЗВЧ (61 ГГц) у поєднанні з ультразвуком або гелій-неоновим лазером: ІАМ, відповідно, відрізнявся від контрольного зразку лише на 1,6 % і 0,7 %. Адсорбція бактеріального антигена, одержаного за допомогою ультразвуку у поєднанні з гелій-неоновим лазером, на формалінізованих еритроцитах людини призвела навіть до зниження індексу адгезивності мікроорганізмів на 7,1 %.

Таким чином, різні фізичні фактори по-різному впливають на поверхневі структури бактеріальних клітин коринебактерій. Це підтверджується порівняльними даними біохімічних досліджень бактеріальних антигенних препаратів, одержаних при дез-

інтеграції мікробних клітин ЕМВ НЗВЧ і УЗ (**табл. 2**).

Можна припустити, що при дезінтеграції більшістю з узятих до експериментів фізичних факторів у рідку фазу мікробної суспензії звільнюються поверхневі білки-піліни, які є основою для полімеризації пілей і прикріплення їх до пептидоглікану клітинної стінки коринебактерій за умови збереження активності полімеризуючих сортаз, і адгезивність тест-штаму підвищується. Навпаки, зменшення адгезивності тест-культури відбувається, вірогідно, при відокремленні поверхневих молекулярних структур мікробних клітин коринебактерій, котрі конкурентно блокують рецептори еритроцитів, і мікробні клітини тест-штаму в певній мірі відсторонюються від прикріплення до еритроцитів.

Висновки. Усі досліджувані антигенні препарати в тій чи іншій мірі містили активні у відношенні до адгезії компоненти, перспективні у якості антиколонізаційного фактору для *C. diphtheriae*, і можуть бути використані для конструювання дифтерійних вакцин.

Перспективи подальших досліджень. Наступним етапом досліджень стане вивчення впливу одержаних експериментальних антигенних препаратів на показники неспецифічного імунітету та ад'ювантної дії щодо нативного очищеного дифтерійного анатоксину в досліді на лабораторних тваринах.

References

1. Krachler AM, Orth K. Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence*. 2013 May; 15 (4/4): 284-94. DOI: 10.4161/viru.24606
2. Swaminathan A, Mandlik A., Swierczynski A., Gaspar A., Das A., Ton-That H. Housekeeping sortase facilitates the cell wall anchoring of pilus polymers in *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol*. 2007 Nov; 66 (4): 961-74. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05968.x
3. Yelyseyeva IV, Babich YM, Belozersky VI, Zhdamarova LA, Kolpak SA, Isayenko YeYu. Study of Specific Activity of Experimental Samples of Complex Diphtherial Candidate Vaccines. *The Odessa Medical Journal*. 2016; 6: 16-7. [Ukrainian].
4. Yelyseyeva IV, Babich YM, Belozersky VI, Zhdamarova LA, Kolpak SA. Effect of Experimental Preparations of Diphtheria Bacterial Antigens, Obtained by Physical Factors on Adhesion of Test Strains of *C. diphtheriae*. *Visnyk Problem biologii i Medicyny*. 2016; 4 (133): 264-68. [Ukrainian].
5. Yelyseyeva IV, Babich YM, Zhdamarova LA, Belozersky VI, Isayenko YeYu, Kolpak SA. Anti-adhesive Strategy in Development of Combined Antidiphtheric Vaccine as a Perspective Preventive Measure of *Corynebacteria diphtheriae* Circulation Among the Population. *Children infections*. 2015; 14 (3): 30-33. [Russian]. DOI:10.22627/2072-8107-2015-14-3-30-33
6. Yelyseyeva IV, Babich YM, Zhdamarova LA, Belozersky VI, Kolpak SA, Balak OA. Study of Effects of Diphtheria Bacterial Antigenic Preparations Obtained by Means of Electromagnetic Radiation of Ultrahigh Frequency on the

- Formation of Humoral Antitoxic Immunity and Colonization Resistance in Experimental Animals. *Visnyk Problem Biologii i Medicyny*. 2015; 3 (93): 277-82. [Ukrainian].
7. Yelyseyeva IV, Babych YeM, Zhdamarova LA, Belozersky VI, Isayenko YeYu, Kolpak SA. Anti-adhesive Therapies as a Contemporary Means to Fight Infectious Diseases and Adherence Factors of *Corynebacteria diphtheriae*. *Annals of Mechnikov Institute*. 2014; 2: 7-19. Available from: www.imiamn.org.ua/journal.htm [Russian].
 8. Brilis VI, Briline TA, Lentsner KhP, Lentsner AA. Metodika izucheniya adgezivnogo protsessa mikroorganizmov. *Laboratornoe delo*. 1986; 4: 210-12. [Russian].
 9. Kharseeva GG, Alieva AA. Adgeziya *Sorynebacterium diphtheriae*: rol poverkhnostnykh struktur i strukturnyy mekhanizm. *Zhurnal mikrobiologii*. 2014 Iyul-Avgust; 4: 109-17. [Russian].
 10. Shmeleva EA, Makarova SI, Baturina IG, Korzhenkova MP, Chistyakova GG, Ksenofontova MK, Filatov NN. Spetsificheskie antitela i ikh rol v formirovani protivotdiferiynogo immuniteta. *Zhurnal mikrobiologii*. 2005; 1: 38-43. [Russian].

УДК 615.371:579.871.1:576.524:616-097

ИЗУЧЕНИЕ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНОВ *C. DIPHTHERIAE*, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ПОМОЩИ КАСКАДНОЙ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК РАЗНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ

Елизеева И. В., Бабич Е. М., Белозерский В. И., Ждармарова Л. А., Колпак С. А., Гурин О. В., Забелина И. А., Коваленко О. И.

Резюме. Статья посвящена разработке вакцин нового поколения против манифестного проявления и персистирующей формы дифтерийной инфекции на основе выделения нативных бактериальных антигенных комплексов при помощи каскадной дезинтеграции с применением физических факторов. Целью исследования стало определение оптимальных режимов каскадной дезинтеграции микробных клеток *C. diphtheriae* на основе изучения влияния полученных антигенных препаратов на адгезивные свойства тест-штамма *C. diphtheriae*. Микробную суспензию музейного штамма *C. diphtheriae* var. *gravis*, tox+, подвергали обработке моно- и комбинированными физическими факторами в разных режимах облучения, а именно: ультразвуком средней частоты (УЗ), узкополосным электромагнитным излучением в сверхвысококачастотном диапазоне (ЭМВ СВЧ), лазерным облучением в терагерцовом и красном оптическом диапазоне. Полученные дезинтеграты центрифугировали, отделяли супернатанты и добавляли их к суспензии формализированных эритроцитов человека, после экспозиции изучали адгезивные свойства тест-штамма *C. diphtheriae*. Большинство антигенных препаратов в той или иной степени повышали адгезивные свойства коринебактерий. Наиболее эффективными оказалось действие ЭМВ НЗВЧ (42,2 ГГц), терагерцовый лазер и комбинация ультразвука с терагерцовым лазером: индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ) повысился в 1,6-1,7 раза. Менее всего воздействовали на адгезивную активность дифтерийной культуры антигенные препараты, полученные при помощи ЭМВ СВЧ (61 ГГц) в соединении с ультразвуком или гелий-неоновым лазером: ИАМ, соответственно, отличался от контрольного образца лишь на 1,6 % и 0,7 %. Комбинация ультразвука с гелий-неоновым лазером обусловила даже снижение ИАМ на 7,1 %. Значительная разница в содержании белка в исследуемых бактериальных антигенных препаратах, полученных при дезинтеграции микробных клеток ЭМВ СВЧ и УЗ, подтверждают, что разные физические факторы по-разному влияют на поверхностные структуры бактериальных клеток коринебактерий. Полученные антигенные препараты перспективны в качестве антиколониционного фактора для *C. diphtheriae* для использования в составе комбинированных дифтерийных вакцин против бактерионосительства дифтерийной инфекции.

Ключевые слова: *C. diphtheriae*, патогенасоциированные молекулярные структуры, дезинтеграция, ультразвук, электромагнитное излучение сверхвысокой частоты, лазерное излучение, дифтерийная вакцина.

UDC 615.371:579.871.1:576.524:616-097

Examination of Adhesive Properties of *C. diphtheriae* Surface Antigens Obtained by the Cascade Disintegration of Microbial Cells by Different Physical Factors

Yelyseyeva I. V., Babych Ye. M., Zhdamarova L. A., Belozersky V. I., Isayenko Ye. Yu., Kolpak S. A., Gurin O. V., Zabelina I. A., Kovalenko O. I.

Abstract. The purpose of the article is to examine new generation vaccines against diphtheria infection on the basis of the native bacterial antigenic complexes isolation by cascade disintegration with the use of physical factors. The aim of the study is to determine the optimal regimes of cascade disintegration of *C. diphtheriae* microbial cells on the basis of studying the effect of the antigenic preparations obtained on the adhesive properties

of the test strain *C. diphtheriae*. The microbial suspension of the museum strain *C. diphtheriae* var. *gravis*, tox +, were subjected to treatment with mono- and combined physical factors in different irradiation regimes, namely: ultrasound of the middle frequency, narrowband electromagnetic radiation in the microwave range, laser irradiation in the terahertz and red optical range. The resulting disintegrants were centrifuged, the supernatants were separated and added to the suspension of formalized human erythrocytes, after exposure, the adhesive properties of the *C. diphtheriae* test strain were studied. Most antigenic preparations to some extent increased the adhesive properties of corynebacteria. The most effective was the action of electromagnetic radiation of ultrahigh frequency (42.2 GHz), a terahertz laser and a combination of ultrasound with a terahertz laser: the index of the adhesiveness of microorganisms (IAM) increased 1.6-1.7 times. The antigenic preparations obtained with electromagnetic radiation microwave (61 GHz) in conjunction with ultrasound or helium-neon laser least of all affected the diphtheria culture's adhesive activity, IAM, respectively, differed from the control sample only by 1.6% and 0.7%. The combination of ultrasound with a helium-neon laser caused a decrease in IAM by 7.1%. The significant difference in the protein content of the bacterial antigen preparations studied, was obtained during the disintegration of microbial cells by electromagnetic radiation of ultrahigh frequency and ultrasound, confirm that certain physical factors affect the surface structures of bacterial cells of the corynebacteria in a different way. The resulting antigenic preparations are promising as an anti-colonization factor for *C. diphtheriae* for use in combination diphtheria vaccines against bacterial carry of diphtheria infection.

Keywords: *C. diphtheriae*, pathogenated molecular structures, disintegration, ultrasound, microwave ultrahigh frequency, laser radiation, diphtheria vaccine.

Стаття надійшла 18.08.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування