

CYTOKINE PROFILE OF MICE IMMUNIZED BY COMPLEX OF RECOMBINANT OPRF AND ATOX ANTIGENS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Kalinichenko E. O., Soldatenkova A. V., Kaloshin A. V., Shotov S. A.,
Akhmatova N. K., Mikhailova N. A.

FGBNU Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Currently, infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* are an important medical problem. Their treatment is extremely difficult because of the broad antibiotic resistance of the pathogen. **Objective:** to study the effect of immunization with a recombinant antigens of *Pseudomonas aeruginosa* on the concentration of cytokines in the serum of mice. **Materials and methods.** Mice were injected intraperitoneally with recombinant 25 µg OprF and 50 µg of toxoid. The cytokine responses of mice were monitored by using flow cytometry analysis at 2, 4, 6 and 24 hours after immunization («FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex»). **Results.** The dynamics of the cytokine levels in the sera of mice was revealed: after 4 hours IL-1α, IL-5; 8 hours later, IL-1β, IL-2, IL-4, and Th17/Th21/Th22 cytokines-IL-17A and IL-22 and IL-21; 24 hours later, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α and IFN-γ. **Conclusion.** Candidate vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* based on the recombinant proteins OprF and aTox activates both cellular and humoral immune system with induction of Th1, Th2 and Th17 responses.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, recombinant proteins, cytokines

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФАКТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ОТНОШЕНИИ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ ШТАММОВ

Каримов И. Ф., Базарова Ю. Ю.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия

Молекулярные компоненты сыворотки крови оказывают неодинаковое влияние на различные группы бактерий. В работе использованы штаммы с двумя типами клеточной стенки и разными экологическими особенностями. Определена роль иммуноглобулинов и С5-белка системы комплемента в интенсивности развития бактерицидного эффекта в отношении люминесцирующих бактерий.

Ключевые слова: эффекторы иммунитета, антитела, комплемент, бактериальные биотесты, lux-гены

Различные молекулярные факторы сыворотки крови, в первую очередь белки и пептиды, выполняют различные функции, включая распознавание и разрушение чужеродных структур [1]. К этой группе можно отнести иммуноглобулины, белки системы комплемента, антимикробные пептиды, а также ряд ферментов, способствующих деградациии клеточных стенок бактерий [2]. При этом данные компоненты оказывают взаимное влияние друг на друга, обеспечивая более интенсивную активацию, что, к примеру, реализуется

посредством активации системы комплемента через белок С1 при наличии антител к антигенам патогена.

Возможностью использования люминесцирующих бактерий при оценке воздействия бактерицидных систем является сопряженность свечения, являющегося интегрированной частью метаболизма, и ростовой способности культуры [3]. В связи с этим, в работе по оценке активности сыворотки крови нами были использованы как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии, основ-

ным фактором воздействия на которые являются система комплемента и катионные антимикробные пептиды. Нами были определены концентрации иммуноглобулинов класса G, как важнейших антител, циркулирующих в крови и обеспечивающих маркирование патогенов для фагоцитов и первичных белков каскадной системы комплемента, а также белок C5, представляющий собой ключевое звено в формировании мембраноатакующего комплекса и объединяющее как классический, так и альтернативный пути.

В работе использованы три рекомбинантных люминесцирующих штамма бактерий, сконструированных на основе *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *Bacillus subtilis*, несущих *luxCDABE*-гены *Photorhabdus luminescens*, суточную культуру выращивали на LB-агаре (Sigma-Aldrich, США) с добавлением селективного маркера. В качестве источника бактерицидных факторов использовали сыворотку крови ($n = 30$). Для определения подавления свечения бактерий использовали биолюминесцентный метод, при котором реакционная смесь содержала бактерии и сыворотку крови в соотношении 1:1 [4]. Помимо этого бактерицидную активность сыворотки крови оценивали нефелометрическим способом [5]. Уровень иммуноглобулинов и C5 белка системы комплемента оценивали с помощью иммуноферментного анализа с использованием диагностических наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) и ООО «Цитокин» (Россия).

Проведение прямого иммуноферментного анализа по содержанию IgG в анализируемых образцах выявило, что диапазон концентраций составляет от 14,8 до 28,2 мг/мл, при этом средний показатель равен $21,5 \pm 3,0$ мг/мл. В дальнейшем полученные данные нами были сопоставлены с показателями свечения использованных биосенсоров при контакте с этими же образцами сыворотки крови.

Так, в случае с люминесцирующим штаммом *E. coli* уровень свечения в целом характеризовался околонулевыми значениями, в связи с чем прямой зависимости от концентрации анализируемых иммуноглобулинов не было обнаружено. Аналогичная картина формировалась при использовании штамма *S. typhimurium*, что демонстрирует общность регистрируемых эффектов и определяется характером строения клеточной стенки. Од-

нако, в случае сопоставления анализируемых параметров в отношении штамма *B. subtilis*, выявлена обратная зависимость, что с одной стороны обусловлено большим уровнем остаточной люминесценции данного биосенсора, а также принципиально иным типом клеточной стенки. Несмотря на нечувствительность указанного выше грамположительного штамма к системе комплемента, и, как следствие, отсутствия роли числа взаимодействующих с поверхностью клетки иммуноглобулинов, потенциально обеспечивающих активацию белка C1, снижение свечения в образцах с высоким содержанием антител связано с возрастанием напряженности клеточной стенки, что облегчает прохождение катионных пептидов сквозь нее.

Далее используемые образцы сыворотки крови были протестированы на количественное содержание белка C5 системы комплемента. Выявлено, что данный показатель встречается в диапазоне от 87 до 280 нг/мл со средним уровнем концентрации 157 ± 12 нг/мл, после чего нами были сопоставлены полученные данные с показателями биолюминесценции.

Для биосенсоров, у которых клеточная стенка построена по грамотрицательному типу и содержит наружную фосфолипидную мембрану, характерна обратная зависимость между уровнем остаточной люминесценции и концентрацией белка C5. При этом более выраженная отрицательная кривая регрессии характерна для *S. typhimurium*, свидетельствующее о большей зависимости повреждающего воздействия в отношении данного штамма со стороны системы комплемента. С другой стороны, грамположительный штамм характеризовался разнонаправленностью показателей свечения и концентрации белка C5, что снова демонстрирует устойчивость данных биосенсоров к термолabileльным компонентам сыворотки крови.

Таким образом, выявлены количественные характеристики ключевых молекулярных факторов анализируемых образцов сыворотки крови, а также проведено их сопоставление с уровнем свечения бактерий. Установлено, что иммуноглобулины при их наличии в физиологической норме обеспечивают бактерицидный эффект с «запасом», тогда как более важным оказывает концентрация белков системы комплемента, обеспечивающий формирование повреждений на мембране.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ройт А. Иммунология: учебник: пер. с англ. / А. Ройт, Д. Бростофф, Д. Мейл. – Москва: Мир, 2000. – 593 с.
2. Бухарин О.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине / О.В. Бухарин, Н.В. Васильев. – Томск: Изд-во Томского университета, 1974. – 209 с.
3. Данилов В.С. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий / В.С. Данилов и др. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. – 2002. – № 3. – С. 20-24.
4. Дерябин Д.Г. Особенности использования биолюминесцентных тест-систем при исследовании абиотических сред и биологических жидкостей. / Д.Г. Дерябин, Е.Г. Поляков, И.Ф. Каримов // Вестн. Оренбург Гос. Универ. – 2004. – С. 101-104.
5. Бухарин О.В. Фотонепелометрический метод определения бактерицидной активности сыворотки крови / О.В. Бухарин, В.Л. Созыкин. В сб.: Факторы естественного иммунитета, Оренбург. 1979. – С. 43-45.

MOLECULAR FACTORS ROLE IN FORMING SERUM BLOOD BACTERICIDE PROPERTIES IN RESPECT OF LUMINESCENT STRAINS

Karimov I.F, Bazarova Yu.Yu.

Orenburg State University, Orenburg, Russia

Molecular components of blood serum have multidirectional effects on different groups of bacteria. In the work strains with two types of cell wall and ecological features were used. The role of immunoglobulins and C5 protein of the complement system in the intensity of bactericidal effect against luminescent bacteria was determined.

Key words: immunity effectors, antibodies, complement, bacterial biotests, lux-genes

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПОЗИТА СВЕРХВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИЭТИЛЕНА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ХРЯЩЕВОГО БИОИМПЛАНТАТА

Киселевский М. В.¹, Лебединская О. В.², Анисимова Н. Ю.¹,
Копылов А. Н.¹

¹ФГБУ «РОНЦ им Н. Н. Блохина» РАМН, Москва; ²ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» МЗ России, Пермь, Россия

Целью данной работы являлось исследование биологических и механических свойств материала, изготовленного из сверхвысокомолекулярного полиэтилена (СВМПЭ). Исследования механических свойств показали, что материал, приготовленный из СВМПЭ с использованием механической активации и с добавкой Al₂O₃, обладает самыми высокими механическими характеристиками, в частности, наибольшей стойкостью к истиранию по сравнению с образцами СВМПЭ без добавки Al₂O₃ и не подвергнутого механической активации. Через 60 суток после ортотопической трансплантации образцов из данного материала крысам было отмечено отсутствие каких-либо признаков воспаления, клеточной инфильтрации, разрушения образца и дальнейшего разрушения костно-хрящевого дефекта. Образец оставался на месте имплантации без смещений. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования СВМПЭ в качестве материала для создания имплантатов для замещения хрящевых дефектов.

Ключевые слова: сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ), хрящ, репарация, имплантат