

Анти-адгезивная стратегия в разработке комплексных противодифтерийных вакцин как перспективная мера снижения циркуляции *Corynebacterium diphtheriae* среди населения

И. В. ЕЛИСЕЕВА, Е. М. БАБИЧ, Л. А. ЖДАМАРОВА, В. И. БЕЛОЗЕРСКИЙ, Е. Ю. ИСАЕНКО, С. А. КОЛПАК

Государственное учреждение «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины», Харьков, Украина

Исследование посвящено разработке новых бактериальных дифтерийных вакцин, направленных на предупреждение колонизации слизистых оболочек, формирование бактерионосительства и способствующих снижению циркуляции *C. diphtheriae* среди населения. В качестве основы кандидат-вакцины предлагается дифтерийный бактериальный антигенный препарат, полученный с помощью электро-магнитного излучения сверхвысокой частоты из культуры *C. diphtheriae*, var. *gravis*, tox +.

Ключевые слова: дифтерийные вакцины, *C. diphtheriae*, дифтерийные бактериальные антигены, адгезия, электро-магнитное излучение сверхвысокой частоты

Anti-adhesive Strategy in Development of Combined Antidiphtheritic Vaccine as a Perspective Preventive Measure of *Corynebacteria diphtheriae* Circulation Among the Population

I. V. Yelyseyeva, Ye. M. Babich, L. A. Zhdamarova, V. I. Belozersky, Ye. Yu. Isayenko, S. A. Kolpak

State Institution «Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Science of Ukraine», Kharkov, Ukraine

A study is devoted to the development of new bacterial diphtheria vaccines aimed at prevention adhesion of microbial cells to host's pharyngeal epithelial cells and thus limit colonization of mucous membranes, bacteria carrier state formation and promoted to *C. diphtheriae* circulation decrease among the population. As a base of the candidate-vaccine we suggest the diphtheria bacterial antigenic preparation obtained by use of electro-magnetic radiation of ultrahigh frequency from a culture of *C. diphtheriae*, var. *gravis*, tox +.

Keywords: diphtheria vaccines, *C. diphtheriae*, diphtheria bacterial antigens, adhesion, electromagnetic radiation of microwave frequency

Контактная информация: Елисеева Ирина Витальевна — ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики каплевых инфекций, Государственное учреждение «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова Национальной академии медицинских Украины»; ул. Пушкинская, 14—16, г. Харьков, Украина, 61057; altai89@rambler.ru

Yelyseyeva Iryna Vitaliyevna, senior researcher, leading scientific associate of respiratory infection prevention laboratory, State Institution «Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Science of Ukraine»; Pushkinskaya Str., 14/16, Kharkov, Ukraine, 61057; altai89@rambler.ru
УДК 616.921:579.871

Эпидемическое возвращение дифтерии в странах Восточной Европы в 1990-х годах стало свидетельством постоянной угрозы этого, как уже считалось к тому времени, редкого заболевания. Медицинское сообщество вынуждено было признать, что *Corynebacterium diphtheriae* все еще является глобальным медицинским возовом, который требует пристального внимания и разработки новых подходов для борьбы с инфекцией [1—4].

Основой эпидемического процесса дифтерии является циркуляция инфекции среди населения посредством бактерионосительства и легких, не диагностированных форм заболевания, которые определяют сохранение резервуара инфекции в человеческой популяции [5]. В межэпидемический период спорадические случаи генерализованных заболеваний, при своевременной диагностике, не представляют собою масштабной угрозы инфицирования большого количества людей. Выявленных в очагах дифтерии бактерионосителей saniруют антибиотиками, однако эффективные методы лечения состояния стойкого носительства отсутствуют. Таким образом, на практике латентная передача дифтерийной инфекции остается, в

основном, за рамками противоэпидемических и профилактических мероприятий.

Официальной доктриной ВОЗ по вопросу специфической иммунопрофилактики дифтерии является предупреждение тяжелых, токсических форм заболевания путем создания коллективного иммунитета с не менее чем 90-процентным охватом населения 3-кратной иммунизацией дифтерийным анатоксином [6].

Текущее десятилетие — 2011—2020 гг. — Всемирная организация здравоохранения объявила десятилетием вакцин. Глобальный план действия по отношению к вакцинам (ГПДВ), одобренный 194 странами-членами Всемирной ассамблеи здравоохранения в мае 2012 года, является рамочным документом для предупреждения к 2020 году миллионов случаев смерти от инфекций, управляемых средствами специфической профилактики. ГПДВ направлен на укрепление плановой иммунизации и предусматривает следующие задачи: (1) достижение целевых показателей по охвату вакцинацией; (2) наращивание темпов борьбы с инфекциями, которые можно предотвратить с помощью вакцин; (3) внедрение новых и улучшенных вак-

цин; (4) внедрение разработок для получения вакцин и технологий следующего поколения [6].

Общепринятым маркером защищенности человека от заболевания дифтерией является уровень антитоксина в крови. Однако, как известно, поствакцинальный анитоксический иммунитет не предотвращает колонизацию коринебактериями дифтерии слизистых оболочек и состояние бактерионосительства *C. diphtheriae* [5, 7]. В существующих вакцинах против дифтерии не задействован спектр бактериальных антигенов, индуцирующих интегральный ответ иммунной системы организма на совокупный патогенный потенциал возбудителя, направленный на эффективное проникновение патогена в макроорганизм. Таким образом, искусственный активный анитоксический иммунитет можно считать необходимым, но не достаточным условием защищенности от дифтерии. Подтверждением этому может служить как важнейшая особенность последней эпидемии дифтерии — возникновение и развитие ее на фоне высоких показателей привитости и иммунности, так и существенная доля привитых лиц среди заболевших дифтерией в разных странах и в предшествующие годы [1, 3, 4]. Закономерно возникает вопрос о необходимости разработки новых средств иммунопрофилактики дифтерии на основе изучения бактериальных антигенов, ответственных за формирование резистентности организма к инвазии патогена [5, 7].

Для многих патогенных бактерий инфекция инициируется только после адгезии микроорганизма к поверхности клетки хозяина, и, чтобы вызвать инфекционный процесс, возбудители, используя адгезины, должны стабильно колонизировать поверхность слизистых [8]. Если воспрепятствовать адгезии бактерий, то можно предотвратить и соответствующую инфекцию. Этот подход формирует основу нескольких анти-адгезивных стратегий, которые были предложены для предупреждения разнообразных бактериальных инфекций [9, 10].

Бактериальное прикрепление можно подавлять, вмешиваясь в биосинтез адгезинов, их сборку или в сборку рецепторов хозяина — молекул распознавания адгезинов, а также используя растворимые молекулы или сконструированные микробы, пробиотики, пищевые добавки, которые способны к конкурентному замещению адгезина от хозяина или рецептора хозяина от адгезина. Поверхностные эпитопы связывания адгезинов с рецепторами можно блокировать также антителами против бактериальных адгезинов посредством вакцинации адгезинами или их аналогами [11, 12].

Хозяина можно прямо или пассивно иммунизировать, используя бактериальный адгезин, мульти-субъединичные адгезивные органеллы, такие как фимбрии, фрагмент иммуногенного пептида, основанный или на индивидуальном адгезине, или на консенсусе производных из группы адгезинов, а также ДНК-вакцины, кодирующие адгезин или его часть [11—13]. Но если адгезивные факторы грам-отрицательных микроорганизмов изучены достаточно глубоко,

для грам-положительных микробов эта сфера стремительно развивается [14].

Конструирование специфических противодифтерийных профилактических препаратов, которые препятствовали бы адгезии микробных клеток к фарингеальным эпителиальным клеткам хозяина может стать эффективным средством в ограничении колонизации слизистых оболочек и уменьшения циркуляции *C. diphtheriae* среди населения и новой стратегией разработки противодифтерийных вакцин [5, 7, 14].

Целью первого этапа наших экспериментов стало изучение возможности получения антигенной субстанции для бактериальной дифтерийной кандидат-вакцины с повышенными адгезивными свойствами из культуры *C. diphtheriae*.

Материалы и методы исследования

Адгезию *C. diphtheriae* исследовали известным способом [15]. Объектом исследования был взят музейный штамм *C. diphtheriae*, var. *gravis* to x + № 255. Адгезивные свойства возбудителя дифтерии усиливали с помощью воздействия электромагнитного облучения сверхвысокой частоты (ЭМИ СВЧ) [16].

Суточную культуру *C. diphtheriae* № 255, выращенную на 10 %-ом сывороточном агаре, смывали стерильным физиологическим раствором (рН 7,2) и готовили густую суспензию, оптическая плотность которой по оптическому стандарту ГИСК им. Л. А. Тарасевича составила 14 млрд. м.т./мл. Из нее готовили рабочую суспензию *C. diphtheriae* с концентрацией 10^9 м.т./мл, которую разделили на равные по объему образцы — опыт и контроль.

Для повышения адгезивности культуры *C. diphtheriae* использовали узкополосное ЭМИ СВЧ при помощи электромагнитного генератора Г4-142, предоставленного ГУ «Институт радиопизики и электроники им. А. Я. Усикова Национальной академии наук Украины».

В пробирки № 1 (опыт) и № 2 (контроль) вносили по 0,5 мл взвеси формализированных эритроцитов человека и, соответственно, облученной и не облученной культуры *C. diphtheriae* в концентрации 10^9 м.т./мл. Инкубировали смеси при температуре 37°C в течение 30 минут, время от времени встряхивая.

Готовили мазки, высушивали, фиксировали фиксатором Майн-Грюнвальд, окрашивали по Романовскому-Гимза и изучали активность адгезии в световом микроскопе. Всего было сделано 6 мазков облученной культуры и 6 контрольных мазков, в каждом из которых просматривали не менее 50 эритроцитов. Подсчитывали количество эритроцитов, несущих прикрепленные бактерии, и количество бактерий, прикрепившихся к каждому из них. Вычисляли следующие показатели: средний показатель адгезии (СПА) — среднее количество микробов, которые прикрепилась к одному эритроциту, коэффициент адгезии (КА) — процент эритроцитов, которые имели на своей поверхности прикрепленные микробы, индекс адгезив-

Таблица 1. Показатели адгезии тест-штамма *S. diphtheriae* после его облучения ЭМИ СВЧ

СПА		КА		ИАМ	
опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
3,2 ± 0,06	2,2 ± 0,06	82 ± 0,4	72 ± 0,5	4,0 ± 0,06	3,0 ± 0,07

Таблица 2. Результаты биохимического анализа исследуемых образцов антигенных субстанций *S. diphtheriae*

Антигенные субстанции	Концентрация белка, мг/мл	Липотейхоевые кислоты, мкг/мл		
		Глицерин тейхоевая	Рибит тейхоевая	Маннит тейхоевая
СН _о	3,6 ± 0,06	61,8 ± 0,4	33,6 ± 0,3	19,5 ± 0,3
СН _к	2,7 ± 0,06	57,8 ± 0,4	29,9 ± 0,3	15,44 ± 0,2

Таблица 3. Показатели адгезии тест-штамма *S. diphtheriae* к эритроцитам человека, предварительно выдержанным с исследуемыми антигенными субстанциями

№№ пп	СПА		КА		ИАМ	
	СН _о	СН _к	СН _о	СН _к	СН _о	СН _к
1*	1,7 ± 0,04	3,4 ± 0,04	68,7 ± 0,9	86,3 ± 0,2	2,3 ± 0,03	4,0 ± 0,06
2*	1,1 ± 0,02	2,6 ± 0,05	59 ± 0,5	75,4 ± 0,2	1,9 ± 0,01	3,5 ± 0,07
К	3,2 ± 0,06	2,2 ± 0,06	82 ± 0,4	72 ± 0,5	4,0 ± 0,06	3,0 ± 0,07

1* — оптическая плотность исходной микробной суспензии 1 млрд. м.т./мл по оптическому стандарту ГИСК им. Л. А. Тарасевича; 2* — оптическая плотность 14 млрд. м.т./мл; К — контроль

ности микроорганизмов (ИАМ) — отношение СПА до КА умноженное на 100.

Результат оценивали, сравнивая средние показатели адгезии в опыте и в контроле по следующим критериям: ИАМ ≤ 1,75 — отсутствие адгезивности; 1,76 ≤ ИАМ ≤ 2,5 — низкая степень адгезивности; 2,5 ≤ ИАМ ≤ 4,0 — средняя адгезивность; ИАМ > 4,0 — высокая адгезивность бактерий.

Для проведения биохимических исследований и последующего изучения влияния исследуемых субстанций поверхностных антигенов дифтерии на процесс адгезии тест-культуры *S. diphtheriae* к эритроцитам человека облученные и не облученные суспензии микробных клеток *S. diphtheriae* центрифугировали и отделяли супернатанты облученных (СН_о) и не облученных (СН_к) образцов.

Антигенные субстанции СН_о и СН_к вносили по 0,5 мл в пробирки с 0,5 мл взвеси формализированных эритроцитов человека, выдерживали полчаса в термостате при температуре 37 °С, а потом изучали адгезивные свойства тест-культуры *S. diphtheriae*.

Результаты и их обсуждение

В таблице 1 представлены показатели адгезии микробной культуры патогенных коринебактерий, облу-

ченной (опыт) и не облученной (контроль) ЭМИ СВЧ (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, в результате облучения микробной суспензии *S. diphtheriae* увеличились все показатели адгезии: СПА вырос в 1,5 раза, КА — на 12,2 %, ИАМ — 4,0 — вырос в 1,3 раза по сравнению с контролем.

Результаты биохимических исследований полученных антигенных субстанций (СН_о и СН_к) представлены в таблице 2.

Концентрация белка в СН_о — 3,6 мг/мл превышала показатель контроля — 2,7 мг/мл в 1,3 раза. Содержание липотейхоевых кислот, входящих в состав мурамил-пептида клеточной стенки коринебактерий, в образце, полученном из облученной ЭМИ СВЧ культуры (СН_о), также превышало соответствующие показатели для образца СН_к: в 1,1—1,3 раза. Полученные результаты свидетельствуют о том, что под действием ЭМИ происходят процессы дезинтеграции микробных клеток с накоплением в жидкой фазе суспензии элементов клеточной стенки.

Следующим этапом исследования стало изучение влияния исследуемых антигенных субстанций СН_о и СН_к на процесс адгезии тест-штамма *S. diphtheriae*, результаты отражены в таблице 3.

Данные таблицы 3 говорят о том, что предварительная экспозиция эритроцитов с препаратами СНО в обоих вариантах концентрации исходных суспензий *C. diphtheriae* (1 млрд. и 14 млрд.) привела к существенному снижению всех показателей адгезии: СПА — в 2,0–2,4 раза, КА — в 1,3 раза, ИАМ — в 1,7–1,9 раза. При этом степень адгезии из интервала $2,5 \leq \text{ИАМ} \leq 4,0$ — группа среднеадгезивных микроорганизмов изменился на интервал $1,76 \leq \text{ИАМ} \leq 2,5$ — группа низкоадгезивных микроорганизмов.

Выводы

1. Узкополосное облучение ЭМИ СВЧ приводит как к увеличению адгезивности самой тест-культуры *C. diphtheriae*, так и к накоплению адгезинов в жидкой фазе микробной суспензии.

2. Полученные антигенные субстанции *C. diphtheriae* с повышенным содержанием адгезинов могут быть использованы в дальнейших исследованиях для изучения их влияния на колонизационную устойчивость при иммунизации ими подопытных животных и являются перспективным компонентом при разработке комплексных дифтерийных вакцин.

Литература / References:

- Чудная Л.М., Оксикюк И.Г., Красюк Л.С., Мороз Л.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по дифтерии в Украине // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 1999. — № 1. — С. 10–12.
Chudnaya L.M. Epidemiologicheskaya situatsiya po difterii v Ukraine [Epidemiological situation regarding to diphtheria in Ukraine] / L.M. Chudnaya, V.G. Oxyuk, L.S. Krasnyuk, L.V. Moroz, S.I. Bryzhata, I.M. Skuratovskaya, Ye.V. Demichovskaya // *Epidemiology and Infectious Diseases*. — 1999. — № 1. — P. 10–12. (In Russ).
- Kolodkina V. Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus / V. Kolodkina, L. Titov, T. Sharapa, F. Grimont, P.A.D. Grimont, A. Efstratiou // *BMC Infect Dis*. — 2006. — V. 6. — P. 129–137.
- Костюкова Н.Н. Уроки дифтерии // Журнал микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 1999. — № 2. — С. 92–96.
Kostyukova N.N. Uroki difterii [The lessons of diphtheria] // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. — 1999. — № 2. — S. 92–96. (In Russ).
- Mattos-Guaraldi A.L. Diphtheria remains a threat to health in the developing world — an overview / A.L. Mattos-Guaraldi, L.O. Moreira, P.V. Damasco, R. Hirata Júnior // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. — 2003. — V. 98. — P. 987–989.
- Шмелева Е.А., Никитин Д.П., Кузиков А.Н., Яровая Л.М. и др. Характеристика дифтерийной бактериальной вакцины и результаты ее изучения в эксперименте и на людях // Тезисы Всероссийского съезда микробиологов и эпидемиологов (22–24 октября 1985, Краснодар). — М., 1985. — С. 69–71.
Shmelyeva Ye.A. Characteristics of diphtheria bacterial vaccine and results of its study in experiment and in human research / Ye.A. Shmelyeva, D. P. Nikitin, A.N. Kuzikov, L.M. Yarovaya, V.P. Bochkova, S.S. Markina, N.N. Kondrashina // *Theses of V All-Russian Microbiologists and Epidemiologists Congress Reports, (22 – 24 October 1985, krasnodar)*. — M., 1985. — P. 69–71. (In Russ).
- Global Vaccine Action Plan 2011 – 2020 [Electronic resource] // Immunization, Vaccines and Biologicals. — Access: http://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/en/
- Харсеева Г.Г., Алиева А.А. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизмы формирования // Журнал микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 2014. — № 4. — С. 109–117.
Kharseeva G.G., Alieva A.A. Adgezia *Corynebacterium diphtheriae*: rol poverchnostnyh struktur I mehanizmy formirovaniya [Adhesion of *Corynebacterium diphtheriae*: the role of surface structures and formation mechanism] // *Zh. Mikrobiol. (Moscow)*. — 2014. — № 4. — С. 109–117. (In Russ).
- Rogers E.A. Adhesion by pathogenic corynebacteria / H.E. Mei, T. Yoshida, W. Sime, F. Hiepe, K. Thiele, R.A. Manz, A. Radbruch, T. Dörner // *Adv Exp Med Biol*. — 2011. — V. 715. — P. 91–103. — Access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21557059>
- Жигангирова Н.А., Гинцбург А.Л. Мишень-специфический скрининг антивирулентных препаратов для терапии хронической инфекции // Журнал микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 2011. — № 4. — С. 107–115.
Zigangirova N.A. Mishen-spetsificheskii skringing antivirulentnyh preparatov dlya terapii chronicheskoy infektsii [Target-specific screening of antivirulence preparations for chronic infection therapy] / N.A. Zigangirova, A.L. Gintsburg // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. — 2011. — № 4. — 107–115. (In Russ).
- Shoaf-Sweeney K.D. Adherence, anti-adherence, and oligosaccharides preventing pathogens from sticking to the host / Shoaf-Sweeney K.D., Hutkins R.W. // *Adv Food Nutr Res*. — 2009. — V. 55. — P. 101–161.
- Krachler A.M. Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy / A.M. Krachler, K. Orth // *Virulence*. — 2013. — V. 15. — N 4. — P. 284–294.
- Cozens D. Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections / D. Cozens, R.C. Read // *Expert Rev Anti Infect Ther*. — 2012. — V.10. — N 12. — P.1457–1468.
- Gaudreau M.C. Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against *Staphylococcus aureus* / M.C. Gaudreau, P. Lacasse, B.G. Talbot // *Vaccine*. — 2007. — V. 25. — P. 814–824. — Access: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X06010401>
- Mandlik A. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development / A. Mandlik, A. Swierczynski, A. Das, H. Ton-That // *Trends Microbiol*. — 2008. — V. 16. — N 1. — P. 33–40. — Access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2841691/>
- Брилис В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис, Т.А. Брилене, Х.П. Ленцнер, А.А. Ленцнер // Лабораторное дело. — 1986. — № 4. — С. 210–212.
Brilis V.I. Metodika izucheniya adgezivnogo protsesssa mikroorganizmov [Method of research of microorganisms adgesive process] / T.A. Brilene, X.P. Lentsner, A.A. Lentsner // *Laboratornoye Delo*. — 1986. — N 4. — S. 210–212. (In Russ).
- Патент № 79848 (UA), МПК (2006) C12N 13/00 A61K 41/00 Способ модуляции адгезивных свойств микроорганизмов / С.В. Калининко, Е.М. Бабич, И.Ю. Кучма, Ю.Л. Волянский и др., заявитель Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова НАМН Украины (UA).- № заявки u 2010 08396; заявл. 22.07.2005; опубл. 25.07.2007, Бюл. № 11.
Patent N 79848 (UA), МПК (2006) C12N 13/00 A61K 41/00 [The way of microorganisms adgesive properties modulation] / S.V. Kalinichenko, Ye.M. Babych, I.Yu. Kuchma, Yu.L. Volyansky et al.; applicant Mechnikov's Institute of microbiology and immunology of Academy of Medical Sciences; Appl. No.: u 2010 08396; Application data: 2005-07-22; Publication date: 2007-07-25; Bul. N 11. (In Russ).