

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

С.Б.Чекнев, Е.И.Вострова, С.В.Кисиль, М.А.Сарычева, А.В.Востров

### МЕХАНИЗМЫ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ В РЕАЛИЗАЦИИ ОБЩИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ В КУЛЬТУРЕ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

*Цель.* Оценка ингибирующего воздействия миллимолярных концентраций двухвалентных катионов металлов, различающихся первичными механизмами реализации токсичности, на культуру *S.pyogenes*. *Материалы и методы.* Суспензию бактерий *S.pyogenes*, содержащую  $10^8$  КОЕ/мл, засеивали газоном на чашки Петри с питательным агаром. Спустя 30 мин на поверхность газона с помощью 36-канального штампа-репликатора каплями объемом по 5 мкл наносили водные растворы солей с концентрацией по катионам металлов от  $5 \times 10^{-3}$  М до  $5 \times 10^{-1}$  М. Затем чашки с культурой бактерий инкубировали в течение суток при 37°C, после чего определяли диаметр зоны задержки роста. Для оценки наличия (отсутствия) в зонах задержки роста жизнеспособных бактерий из центра зоны производили посевы материала в пробирки с питательным бульоном, которые термостатировали в течение срока до пяти суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона. *Результаты.* По действию на газоне культуры *S.pyogenes* в диапазоне концентраций металлов от 50 до 500 мМ относительно невысокую активность демонстрируют катионы меди и железа, промежуточные эффекты реализуют кобальт, никель и марганец, наиболее высокий потенциал отличает катионы цинка. При этом высокую бактерицидную активность проявляют катионы железа и меди, умеренную — катионы цинка, отсутствие регистрируемой бактерицидной активности характеризует действие марганца, никеля и кобальта. *Заключение.* Ингибирующее действие двухвалентных катионов тяжелых металлов на газоне культуры *S.pyogenes* с большой вероятностью включает бактериостатический и бактерицидный компоненты, проявление активности которых определяется первичными механизмами реализации токсических свойств катионов.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 3—9

Ключевые слова: бактерицидное действие, катионы металлов, *S.pyogenes*

*S.B.Cheknev, E.I.Vostrova, S.V.Kisil, M.A.Sarycheva, A.V.Vostrov*

### THE MECHANISMS OF BACTERICIDAL ACTION IMPACT IN COMMON ANTI-BACTERIAL EFFECTS OF METAL CATIONS IN CULTURE OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

*Aim.* The work was performed with the purpose to study an inhibitory action of millimolar concentrations of divalent metal ions, which differ by primary mechanisms of their toxicity, on the culture of *S.pyogenes*. *Materials and methods.* Suspensions of *S.pyogenes* bacteria which contained  $10^8$  CFU/ml were sown by the lawns into the standard Petri dishes coated with the supplemented Nutrient Agar. 30 min later the salt solutions of divalent metals were added by the 5  $\mu$ l drops on the surfaces of the lawns with use of 36-channel stamp replicator. The salt solutions contained the metals tested at the concentrations ranged between  $5 \times 10^{-3}$  M to  $5 \times 10^{-1}$  M. Then the dishes with bacterial cultures were incubated for 24 hrs at 37°C followed by measuring diameter

of the area of culture growth inhibition. The probes of material obtained from the centers of the stunting areas were passed into the centrifuge tubes with the supplemented Nutrient Broth, incubated for up to five days at 37°C and tested for the Broth clarity. *Results.* In presence of the metal concentrations ranged between 50 to 500 mM inhibitory action towards *S.pyogenes* bacteria was registered as relatively low due to the effects of copper or ferrous ions, as intermediate due to the presence of cobalt, nickel or manganese, and as high due to the effects of zinc ions. At the same time ferrous or copper ions demonstrated high bactericidal activity, zinc ions showed relatively low one, whereas manganese, nickel or cobalt were characterized by the lack of bactericidal action registered. *Conclusion.* Inhibitory action of heavy metal divalent ions on the lawns of *S.pyogenes* cultures probably includes bacteriostatic and bactericidal components which impact is determined by primary mechanisms of the ions toxicity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 3—9

Key words: bactericidal action, metal cations, *S.pyogenes*

## ВВЕДЕНИЕ

Токсическое действие высоких концентраций тяжелых металлов на патогенные и условно патогенные бактерии принципиально связано с реализацией двух ключевых механизмов — генерации свободных радикалов кислорода, разрушающих определенные структуры бактериальной клетки, или конкуренции с другими металлами за сайты связывания в макромолекулах, вытеснения этих металлов и блокирования тем самым сигнальных путей, обеспечивающих жизнедеятельность клетки бактерии [6, 9, 11, 12, 19].

Генерация активных метаболитов кислорода в биологических системах в большинстве своем ассоциирована с эффектами катионов железа и меди [11, 15]; блокирование специализированных металлосвязывающих сайтов макромолекул относят к свойствам катионов цинка или марганца, не реализующих свободно-радикальной токсичности, но способных, вместе с тем, ингибировать критически значимые метаболические процессы [13, 16, 17].

Известно, что цинк патоген-специфически снижает экспрессию шигатоксинов и других факторов вирулентности энтеропатогенных эшерихий [7, 8], усиливая, в то же время, активность генов вирулентности патогенных стрептококков, по отношению к которым марганец выступает фактором ограничения персистенции, проявляя свойства антагониста цинка [14]. Медь и цинк специфически ингибируют гемолитическую активность спирохет [10] и функционирование ферментов дыхательной цепи иерсиний [1]. В культурах стафилококков и синегнойной палочки эффекты катионов меди преимущественно реализуются как бактерицидные, действие цинка проявляется статически [3]. Опыты на патогенных и условно патогенных стрептококках позволяют описать патоген-специфическое бактерицидное действие катионов цинка [4].

Понятно, что общие антибактериальные эффекты токсических концентраций катионов тяжелых металлов могут зависеть [3, 7, 8] или не зависеть [1, 4, 10] от первичных механизмов реализации токсичности и, следовательно, получение доказательно предсказуемого результата в отношении конкретной бактериальной популяции требует скрининговых исследований, которые могли бы позволить сопоставить действие катионов металлов в экспериментальной системе, не связанной напрямую с первичными механизмами реализации их токсических свойств [3, 4].

Целью работы явилась оценка ингибирующего воздействия миллимоляр-

ных концентраций катионов металлов, различающихся первичными механизмами реализации токсичности, на культуру *S. pyogenes*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры бактерий *S. pyogenes* предоставлены из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов заведующим лабораторией, к.м.н. В.Г.Жуховицким. В работе использовали три клинических изолята *S. pyogenes*.

Для постановки реакций стандартизованную суспензию бактерий, полученную из суточных культур *S. pyogenes* и содержащую  $10^8$  КОЕ/мл, засеивали газоном из объема 1.0 мл суспензии в физиологическом растворе на стандартные стерильные чашки Петри диаметром 90 мм с питательным агаром Blood Base Agar (HiMedia Lab.), дополненным 10% нормальной лошадиной сыворотки (Микроген) и 1% глюкозы. Спустя 30 мин на поверхность газона с использованием 36-канального штампа-репликатора с диаметром наконечников 2.0 мм каплями объемом по 5 мкл наносили водные растворы сульфатов: меди  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , цинка  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , кобальта  $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , никеля  $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , марганца  $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  и железа  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  в 0.15 М NaCl (pH 7.12 — 7.21) с концентрацией по катионам металлов от  $5 \times 10^{-3}$  М до  $5 \times 10^{-1}$  М.

На препаративном этапе исследования маточные растворы солей стерилизовали методом мембранной фильтрации с использованием насадок для водно-солевых растворов Millex с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore), после чего готовили серии последовательных разведений маточного образца в 0.15 М растворе NaCl, служившим внутренним контролем системы.

После нанесения солевых растворов каплями на газон содержавшие культуры бактерий *S. pyogenes* чашки Петри инкубировали в течение суток при 37°C. По истечении срока инкубации результат реакции учитывали, определяя диаметр зоны задержки роста культуры с использованием угловой линейки Partigen (Behringwerke AG).

На каждом газоне реакцию бактерий на серию разведений соли металла воспроизводили трижды. Для каждого клинического изолята бактерий использовали при этом не менее двух параллельных чашек Петри.

Для проверки наличия (отсутствия) в зонах задержки роста культур жизнеспособных бактерий и установления вклада бактерицидного компонента в действие солей металлов из центра зоны задержки роста микробиологической петлей диаметром 1,0 мм производили посевы материала в пробирки, содержавшие по 5,0 мл питательного бульона Nutrient Broth (HiMedia Lab.), дополненного 10% нормальной лошадиной сыворотки (Микроген) и 1% глюкозы. Образцы термостатировали в течение срока до пяти суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона в сравнении с контрольным — стерильным.

В ходе экспериментов кислотность 0,15 М раствора NaCl контролировали с помощью базового электронного pH-метра Sartorius PB-11, укомплектованного электродом Sartorius PY-P11.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Как показано на рис., в присутствии 50 мМ исследованных катионов металлов на газоне *S. pyogenes* формируются зоны задержки роста, диаметр которых варьирует от 3.86 мм на марганце до 5.64 мм на цинке и составляет в

среднем 4.57 мм. При этом действие катионов цинка в 1.46 раза превосходит эффекты катионов марганца.

В условиях десятикратного (от 50 до 500 мМ) повышения концентрации катионов металлов диаметр зон задержки роста на газоне *S. pyogenes* возрастает в среднем в 1.77 раза. В присутствии 500 мМ исследованных катионов диаметр зон задержки роста бактерий варьирует от 6.2 мм на меди до 9.39 мм на цинке и составляет в среднем (без катионов железа) 8.07 мм. При этом действие катионов цинка в 1.51 раза превосходит эффекты катионов меди (рис.).

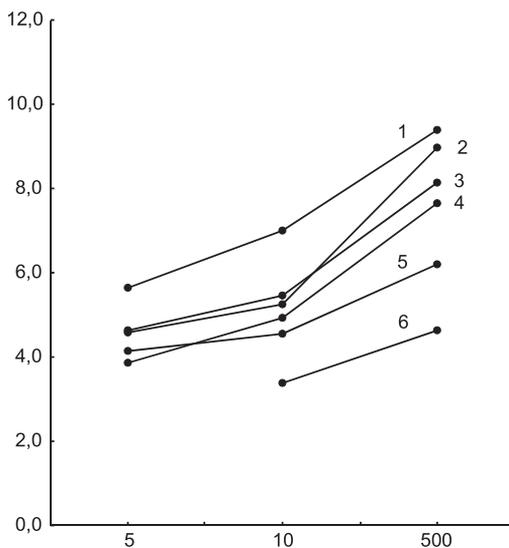
В присутствии 50 мМ катионов железа зона задержки роста *S. pyogenes* не формируется, 100 мМ железа образуют зону с диаметром 3.38 мм, который увеличивается до 4.63 мм, т.е. в 1.37 раза, при повышении содержания железа на газоне до 500 мМ. При этом действие катионов цинка превосходит эффекты 500 мМ катионов железа в 2.03 раза (рис.).

Посевы материала, полученного из зон задержки роста *S. pyogenes*, в питательный бульон обнаруживают, что в присутствии катионов кобальта, никеля и марганца на газоне сохраняются жизнеспособные бактерии, дающие активный рост и размножение в течение срока наблюдения до 5 суток и вызывающие помутнение питательного бульона. В присутствии катионов меди от 80 до 90% (в среднем 86.6%) проб остаются прозрачными, т.е. стерильными, в присутствии железа роста бактерий не обнаруживается в 50 — 100% (в среднем, в 77.7%) наблюдений, катионы цинка вызывают полную гибель бактерий в 10 — 45% (в среднем, в 28.3%) случаев.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных позволяет установить, что по эффектам на газоне культуры *S. pyogenes* исследованные катионы металлов распределяются в соответствии с определенной закономерностью. Относительно невысокую активность демонстрируют медь и железо, промежуточные эффекты реализуют кобальт, никель и марганец, наиболее высокий потенциал отличает катионы цинка. При этом высокую бактерицидную активность проявляют катионы железа и меди, умеренную — катионы цинка, отсутствие регистрируемой бактерицидной активности характеризует действие марганца, никеля и кобальта.

Очевидно, что общее антибактериальное действие исследованных катионов с необходимостью включает в себя бактерицидный и статический компоненты, причем металлы с выраженной бактерицидной активностью вызывают формирование на газоне культуры *S. pyogenes* меньших по диаметру зон задержки роста бактерий, чем катионы, воздействующие по совокупности ре-



**Торможение роста бактерий *S. pyogenes* в присутствии миллимолярных концентраций двухвалентных катионов металлов.**

По оси абсцисс: концентрация катионов металлов, мМ; по оси ординат: диаметр зоны задержки роста, мм. 1 — цинк, 2 — кобальт, 3 — никель, 4 — марганец, 5 — медь, 6 — железо. Представлены обобщенные результаты трех полных независимых постановок.

гистрируемых эффектов статически, но вызывающие образование на газоне заметно больших зон торможения роста культуры. Исключение составляют катионы цинка, формирующие наиболее крупные по размерам зоны задержки роста *S. pyogenes* и реализующие, вместе с тем, выраженное бактерицидное действие.

Исключительность действия цинка, реализующего в культуре *S. pyogenes* выраженные статические и бактерицидные эффекты, обоснованно связывать с его отмечаемыми многими исследователями патоген-специфическими свойствами, проявляющимися многофакторно — с позиций получаемого результата, и многоточечно — с позиций определения мишени локализации и топки реакции [4].

Снижая экспрессию гена *cnt*, кодирующего синтез транспортера кобальта и никеля, и вступая в прямую конкуренцию с кобальтом и никелем на этапе включения в клетку, катионы цинка практически отменяют инфлюкс никеля бактериями *Staphylococcus aureus* [17]. Подобными свойствами не обладают катионы меди, железа или марганца [17]. Специфичность действия цинка в отношении *Streptococcus pneumoniae* обеспечивается его избирательным импортом, реализуемым бактериями за счет работы специфических транспортеров *AdcA* и *AdcAII* [5]. Ингибирование гликолиза, переключение метаболизма на утилизацию галактозы и торможение роста *S. pyogenes* вызываются цинком, примененным в концентрациях, значительно меньших, чем при действии других катионов металлов [16]. В сравнении с катионами железа, меди, никеля, кобальта и марганца цинк выступает наиболее мощным ингибитором экспрессии факторов вирулентности энтеропатогенных и шигатоксигенных *Escherichia coli* [7, 8].

В отличие от цинка, не реализующего свободно-радикальной токсичности, медь и железо — переходные металлы, способные первично взаимодействовать с перекисью водорода, генерировать высокотоксичные гидроксил анион радикалы и атаковать металлосвязывающие сайты ферментов, которые обычно служат для присоединения нетоксичных катионов [19]. При этом двухвалентная и одновалентная медь эффективно конкурирует с другими металлами за белки цитозоля, а трехвалентное железо — за белки периплазмы [18]. Сравнение железа и меди между собой обнаруживает преимущество меди [18]. В ряду двухвалентных катионов аффинность белков к металлам также определяет предпочтительность связывания меди [18]. Не удивительно поэтому, что дополнение питательной среды железом или медью обуславливает повышение чувствительности спирохет *Borrelia burgdorferi* к токсическому действию пероксида [19], описано бактерицидное действие меди на микобактерии в фагосомах [6], а цинк, конкурируя с железом, ингибирует образование свободных радикалов и защищает от их деструктурирующего воздействия сульфгидрильные группы бактериальных белков [19].

Считают, что бактерицидность катионов металлов возрастает с ростом их окислительно-восстановительного потенциала [2]. В ряду исследованных катионов наибольший нормальный потенциал (0,34) демонстрирует медь, которая характеризуется и наиболее высокой электроотрицательностью, определяемой по Л.Полингу (1,9), с которой сопоставимы только катионы никеля (1,91), значительно, в то же время, уступающие меди по нормальному потенциалу (-0,23), но не реализующие в отношении *S. pyogenes* регистрируемого бактерицидного действия, а в культуре *B. burgdorferi* повышающие резистентность спирохет к токсическому воздействию пероксида [19]. Проявляющий третью по уровню в числе исследованных катионов электро-

отрицательность (1,88) при уровне нормального потенциала -0,27 кобальт обладает наиболее выраженным бактериостатическим действием в культурах *S.aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, не реализуя при этом, как и в нашем исследовании на газоне *S.pyogenes*, регистрируемых бактерицидных эффектов [2].

Известно, что определенную роль в поступлении металла в клетку бактерии может играть ионный радиус катиона. Так, *Bacillus subtilis* импортирует металл в комплексе с цитратом. При этом переносчик CitM работает по металлам меньшего ионного радиуса, чем 0.08 нм, а транспортер CitH — большего, чем 0.098 нм [14]. С учетом того, что ионный радиус меди составляет 0.096 нм, обоснованно полагать предпочтительность ее переноса белком CitH — в отличие от всех остальных исследованных катионов, наиболее близкий из которых по ионному радиусу к меди (марганец) имеет показатель 0.091 нм и, скорее всего, уже не будет транспортироваться белком CitH [14]. Но тогда все исследованные в работе (кроме меди) металлы, имеющие ионные радиусы, варьирующие в пределах от 0.078 нм (никель) до 0.091 нм (марганец), получают в качестве переносчика в комплексе с цитратом единственный общий специфический по цитрату транспортер CitM [14]. В условиях их высокой конкуренции между собой за сайты связывания в белках и ферментах [12], накопления в клетке количества катионов, создающего токсическую концентрацию, достаточную для реализации бактерицидного действия, с большой вероятностью, не происходит.

Понятно, что в предложенном контексте рассмотрены лишь отдельные параметры и функциональные показатели взаимодействия катионов металлов с бактериальной клеткой, которое по своей сути столь многопланово и разнообразно, что не подлежит дискретному анализу с точки зрения получения прогнозируемого результата на основе единичных алгоритмов сравнения. Само по себе существование фракции персистеров уже нивелирует возможность регистрации в использованной экспериментальной системе прямого бактерицидного действия даже при наличии такового, поскольку эта переживающая и в дальнейшем персистирующая фракция будет определять последующие рост и размножение бактерий в популяции, потерявшей в результате прямого токсического воздействия до более чем 90% жизнеспособных клеток.

Вместе с тем, если отсутствие регистрируемого бактерицидного действия катионов кобальта, никеля и марганца позволяет лишь допускать наличие в их эффектах бактерицидной компоненты, которую, в принципе, можно пытаться рассчитать аналитически, то достижение в ряде наблюдений полного бактерицидного эффекта катионов меди, железа и цинка свидетельствует о преодолении ими толерантности *S.pyogenes* к тяжелым металлам, неспособности систем детоксикации бактерий обеспечить форсированный эффлюкс катионов и накоплении внутри бактериальных клеток эффективной токсической концентрации. Не исключено при этом, что определенные (по-видимому, начальные) стадии реализации эффекта находятся под контролем статического компонента.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бузолева Л.С., Кривошеева А.М. Влияние тяжелых металлов на размножение патогенных бактерий. Успехи соврем. естествознания. 2013, 7: 30-33.
2. Савченко О.И., Кравчук Т.Н., Тапальский Д.В., Филиппова В.А. Антибактериальное действие катионов тяжелых металлов. Пробл. здоровья и экологии. 2014, 2 (40): 104-109.

3. Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Апресова М.А., Писковская Л.С., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии катионов меди и цинка. Журн. микробиол. 2015, 2: 9-17.
4. Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Кисиль С.В., Анисимов В.В., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus agalactiae* в присутствии катионов меди и цинка. Журн. микробиол. 2017, 3: 26-35.
5. Bayle L., Chimalapati S., Schoehn G. et al. Zinc uptake by *Streptococcus pneumoniae* depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. Molec. Microbiol. 2011, 82 (4): 904-916.
6. Botella H., Stadthagen G., Lugo-Villarino G. et al. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. Trends Microbiol. 2012, 20 (3): 106-112.
7. Crane J.K., Byrd I.W., Boedecker E.C. Virulence inhibition by zinc of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immunity. 2011, 79 (4): 1696-1705.
8. Crane J.K., Naeher T.M., Shulgina I. et al. Effect of zinc on enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Infect. Immunity. 2007, 75 (12): 5974-5984.
9. Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of non-apoptotic cell death. Cell. 2012, 149: 1060-1072.
10. Dupont D.P., Duhamel G.E., Carlson M.P., Mathiesen M.R. Effect of divalent cations on hemolysin synthesis by *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*: inhibition induced by zinc and copper. Vet. Microbiol. 1994, 41: 63-73.
11. Huynh C., Andrews N.W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. Cell. Microbiol. 2008, 10 (2): 293-300.
12. Kirsten A., Herzberg M., Voigt A. et al. Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34. J. Bacteriol. 2011, 193 (18): 4652-4663.
13. Kloosterman T.G., Witwicki R.M., van der Kooi-Pol M.M. et al. Opposite effects of  $Mn^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  on PsaR-mediated expression of the virulence genes *pcpA*, *prtA*, and *psaBCA* of *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 2008, 190 (15): 5382-5393.
14. Lensbouer J.J., Patel A., Sirianni J.P., Doyle R.P. Functional characterization and metal ion specificity of the metal-citrate complex transporter from *Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol. 2008, 190 (16): 5616-5623.
15. Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999, 51: 730-750.
16. Ong C.-I.Y., Walker M.J., McEwan A.G. Zinc disrupts central carbon metabolism and capsule biosynthesis in *Streptococcus pyogenes*. Scientific Reports. 2015, 5: 10 p.
17. Remy L., Carrière M., Derré-Bobillot M. et al. The *Staphylococcus aureus* Opp1 ABC transporter impairs nickel and cobalt in zinc-depleted conditions and contributes to virulence. Molec. Microbiol. 2013, 87 (4): 730-743.
18. Waldron K.J., Robinson N.J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? Nature Reviews Microbiol. 2009, 7 (1): 25-35.
19. Wang P., Lutton A., Olesik J. et al. A novel iron- and copper-binding protein in the Lyme disease spirochaete. Molec. Microbiol. 2012, 86 (6): 1441-1451.

*Поступила 05.09.17*

Контактная информация: Чекнев Сергей Борисович, д.м.н.,  
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)190-43-88

*Е.О.Калиниченко, С.А.Сходова, Н.К.Ахматова, Н.А.Михайлова*

## **ИММУНИЗАЦИЯ БЕЛКАМИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA OprF И aTox УСИЛИВАЕТ ФАГОЦИТАРНУЮ И БАКТЕРИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ У МЫШЕЙ**

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

*Цель.* Изучить влияние иммунизации вакцинным препаратом против синегнойной палочки на фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов периферической крови у мышей. *Материалы и методы.* Препарат: 25 мкг OprF, 50 мкг aTox, сорбированные на 75 мкг гидроксида алюминия (НПО Микроген). Для иммунизации препарат рекомбинантных белков смешивали в равных весовых долях с гелем гидроксида алюминия, разводили в фосфатно-солевом буфере и проводили сорбцию в течение 12 ч при 4°C. Вакцинный препарат вводили мышам-самкам линии BALB/c весом 14 — 16 г внутривентрально в объеме 0,5 мл. Фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови определяли по поглотительной способности убитых нагреванием FITC-меченных микробных клеток *Staphylococcus aureus* нейтрофилами и моноцитами периферической крови иммунизированных мышей методом проточной цитометрии. Бактерицидную активность лейкоцитов крови мышей оценивали в отношении живой культуры *S. aureus* на проточном цитофлюориметре Cytomix FC-500 (Beckman Coulter). *Результаты.* Введение мышам рекомбинантных белков *Pseudomonas aeruginosa* OprF и aTox, сорбированных на гидроксида алюминия, приводило к усилению фагоцитарной и бактерицидной активности *S. aureus* моноцитами и гранулоцитами периферической крови. Максимальное повышение численности фагоцитировавших моноцитов отмечено на 7, а гранулоцитов на 17 сутки после первой иммунизации. Бустерная иммунизация не приводила к дополнительной стимуляции фагоцитарной активности, но численность фагоцитировавших клеток была существенно ( $p < 0,05$ ) выше контроля (интактные мыши). *Заключение.* Кандидатная вакцина против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox активирует клеточное звено иммунной системы с индукцией активности профессиональных макрофагов.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 10—15

Ключевые слова: рекомбинантные белки OprF и aTox *Pseudomonas aeruginosa*, фагоцитоз, бактерицидная активность

*Е.О.Kalinichenko, S.A.Skhodova, N.K.Akhmatova, N.A.Mikhailova*

## **IMMUNIZATION WITH PROTEINS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA OprF AND aTox ENHANCES THE PHAGOCYTTIC AND BACTERICIDAL ACTIVITY OF LEUKOCYTES IN MICE**

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* To study the effect of vaccine preparation against *Pseudomonas aeruginosa* on the phagocytic and bactericidal activity of immunocompetent cells in mice. *Materials and methods.* Preparation: 25 µg of OprF, 50 µg of aTox sorbed by 75 µg of aluminum hydroxide. For immunization, the recombinant protein preparation was mixed in equal weight fractions with an aluminum hydroxide gel, diluted in phosphate buffered saline, and sorbed for 12 hours at 4°C. The vaccine preparation was administered intraperitoneally in 0.5 ml to BALB/c mice. The phagocytic activity of peripheral blood leukocytes was determined from the absorption capacity of heat-killed FITC-labeled *Staphylococcus aureus* by neutrophils and monocytes of immunized mice by flow cytometry. The bactericidal activity of mice blood leukocytes was assessed for the live culture of *S. aureus* using flow cytometry Cytomix FC-500 (Beckman Coulter). *Results.* Administration to mice of recombinant proteins *P. aeruginosa* OprF and aTox sorbed on aluminum hydroxide led to an increase in the phagocytic and bactericidal activity of monocytes and granulocytes of periph-