

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА»**

На правах рукописи

Калиниченко Евгений Олегович

**«ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА
РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ OprF И АНАТОКСИНА
PSEUDOMONAS AERUGINOSA»**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Н.А. Михайлова

Консультант:
доктор медицинских наук
Н.К. Ахматова

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы	11
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : особенности жизнедеятельности.....	11
1.2. Особенности патогенеза синегнойной инфекции и факторы ее риска...13	
1.3. Особенности иммунного ответа при инфекции <i>P. aeruginosa</i> и иммунологические принципы разработки вакцин против нее.....17	
1.4. Основные направления и перспективы разработки вакцин против <i>P. aeruginosa</i>	26
1.5. Заключение к обзору литературы	35
ГЛАВА 2. Методология и методы исследования	37
2.1. Материалы	37
2.2. Иммунизация мышей	38
2.3. Исследование протективной активности.....	38
2.4. Забор крови и получение сыворотки.....	39
2.5. Получение и культивирование лимфоцитов селезенки мышей.....	40
Методы исследования безопасности.....	40
2.6. Исследование острой токсичности.....	40
2.7. Исследование пирогенности.....	41
2.8. Исследование иммунотоксичности.....	42
2.9. Исследование аллергизирующих свойств.....	44
Методы исследования врожденного иммунитета	46
2.10. Получение FITC-меченого <i>Staphylococcus aureus</i>	46
2.11. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов в отношении <i>Staphylococcus aureus</i>	46
2.12. Определение бактерицидной активности лейкоцитов в отношении <i>Staphylococcus aureus</i>	47
2.13. Культивирование дендритных клеток.....	48
2.14. Оценка иммунофенотипа дендритных клеток.....	49

2.15. Определение уровня цитокинов.....	49
Методы исследования адаптивного иммунитета.....	50
2.16. Определение иммунофенотипа лимфоцитов.....	50
2.17. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)	50
2.18. Статистические методы.....	51
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	54
ГЛАВА 3. Исследование безопасности.....	54
3.1. Исследование острой токсичности.....	54
3.2. Исследование пирогенности.....	58
3.3. Исследование иммунотоксичности.....	60
3.4. Исследование аллергизирующих свойств.....	63
ГЛАВА 4. Исследование влияния комплекса рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i> на врожденный иммунитет.....	66
4.1. Исследование влияния иммунизации комплексом рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i> на фагоцитарную активность лейкоцитов мышей.....	66
4.2. Исследование влияния иммунизации комплексом рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i> на бактерицидную активность лейкоцитов мышей.....	69
4.3. Исследование влияния комплекса рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i> на созревание дендритных клеток мышей <i>in vitro</i>	71
4.4. Исследование влияния комплекса рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i> на секрецию цитокинов дендритными клетками мышей <i>in vitro</i>	75
4.5. Исследование цитокинового профиля периферической крови мышей..	80
4.6. Спонтанная и индуцированная фитогемагглютинином секрецию цитокинов лимфоцитами селезенки мышей при иммунизации комплексом рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i>	83

ГЛАВА 5. Влияние комплекса рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i> на адаптивный иммунитет.....	85
5.1. Исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки....	87
5.2. Исследование изотипического спектра секретируемых антител.....	89
5.3. Исследование продолжительности иммунного ответа.....	90
ГЛАВА 6. Исследование протективной активности комплекса рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i>.....	95
ГЛАВА 7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	97
ВЫВОДЫ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Pseudomonas aeruginosa – условно-патогенная бактерия, возбудитель инфекций различной анатомической локализации у пациентов с хроническими заболеваниями и иммунодефицитными состояниями. Эта бактерия – важный внутрибольничный патоген, наиболее часто вызывает пневмонии и раневые инфекции, является возбудителем хронических инфекций органов дыхания у больных муковисцидозом [122, 193, 203].

Синегнойная палочка обладает многочисленными факторами патогенности, обуславливающими преодоление защитных механизмов иммунной системы макроорганизма и тяжесть развивающихся инфекций [65, 102, 182, 260].

Эта бактерия широко распространена во внешней среде, особенно в госпитальных условиях, и может передаваться от человека к человеку. При этом терапия вызванных ею инфекций, как правило, чрезвычайно трудна и малоуспешна ввиду ее значительной резистентности к антибиотикам [193].

Таким образом, становится актуальной разработка альтернативных методов профилактики и лечения инфекций, вызываемых *Pseudomonas aeruginosa*. Одним из важнейших направлений профилактики инфекций является применение вакцин.

Задача создания действенной вакцины от патогенного микроорганизма – всегда сложная и нетривиальная, на которую влияют особенности формирования естественного и искусственного иммунитета, особенности патогенеза и эпидемиологии возбудителя и ряд других факторов.

Разработка вакцины против условно-патогенного микроорганизма, обладающего многочисленными факторами патогенности, является еще более сложной задачей. Как правило, эти возбудители не опасны для здоровых людей, но могут становиться причиной летальных исходов при ряде клинических состояний, сопровождающихся повреждением систем защиты организма. Этим

объясняется особенная сложность создания вакцин, поскольку иммунный ответ у целевой аудитории может оказаться неполноценным [205].

Механизмы протективного действия, обеспечивающие иммунитет к *P. aeruginosa*, могут быть различными для инфекций разной локализации. Это обстоятельство, наряду с различными видами нарушений иммунитета у людей из групп риска по синегнойной инфекции, может потребовать разработки нескольких вакцин для профилактики заболеваний, вызываемых *P. aeruginosa* [169]. Например, при нарушении системного иммунитета, а также при ожогах и травмах часто развиваются бактериемия и системные инфекции *P. aeruginosa*, в то время как при муковисцидозе колонизация легких очень редко осложняется генерализацией инфекции. При муковисцидозе антитела, как правило, в обилии содержащиеся в крови, по-видимому, предотвращают диссеминацию инфекции, но на течение заболевания органов дыхания повлиять бессильны [273].

За прошедшие десятилетия интенсивных исследований был разработан ряд кандидатных вакцин против *P. aeruginosa*, показавших протективную активность на доклинических моделях. Однако эти препараты либо не «дошли» до этапа клинических исследований, либо были отозваны на I, II или III фазе испытаний на людях по причине реактогенности или сомнительной эффективности. Для клинического использования в России и некоторых других странах лицензирована польская вакцина «Псевдовак», представляющая собой смесь экстрактов 7 серотипов *P. aeruginosa*, однако данные об ее эффективности ограничены. К тому же, как и многим вакцинам, полученным из грамотрицательных бактерий традиционными методами, препарату присуща некоторая реактогенность, обусловленная, по-видимому, остаточным содержанием липополисахаридов [2, 18]. Таким образом, в настоящее время в медицинской практике, несмотря на многочисленные исследования, не существует вакцины, которая решила бы проблему профилактики инфекций, вызываемых *P. aeruginosa* [129, 169, 205, 272] – поэтому вопрос получения такой вакцины остается до сих пор актуальным.

При этом важно использование технологичных методов, в частности, генно-инженерных, позволяющих получить высокоочищенные целевые антигены синегнойной палочки, как компоненты препаратов, удовлетворяющих предъявляемым к современным вакцинам требованиям.

Одним из учреждений, занимающихся разработкой противосинегнойных вакцин, стал НИИВС им. И.И. Мечникова, где в последние годы проводились исследования свойств ряда рекомбинантных белков *Pseudomonas aeruginosa*, как возможных антигенов для создания кандидатной вакцины [25].

По результатам работы выбраны наиболее перспективные рекомбинантные белки *P. aeruginosa* – белок наружной мембраны OprF и рекомбинантный анатоксин (aTox, делеционная атоксическая форма экзотоксина А), которые при адсорбции на гидроксиде алюминия и совместном введении проявляли высокие иммуногенные и протективные свойства в опытах на животных [14].

Для подтверждения эффективности этого комплекса становится актуальным изучение иммунобиологических свойств, определяющих его безопасность (токсичности, пирогенности, аллергенности и т.д.), протективную активность и механизмы воздействия на систему иммунитета, обеспечивающие защитный эффект.

Цель исследования: изучение иммунобиологических свойств комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*, адсорбированных на геле гидроокиси алюминия, и исследование его влияния на эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета.

Задачи исследования комплекса адсорбированных рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa*:

- 1) оценить безопасность на лабораторных животных в тестах на острую токсичность, аллергенность и иммунотоксичность;
- 2) изучить влияние на систему врожденного иммунитета: фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов, созревание дендритных клеток и секрецию ими цитокинов, секрецию цитокинов *in vivo* и *in vitro* (спленоцитами) после иммунизации;
- 3) исследовать действие на систему адаптивного иммунитета: изменения субпопуляционного состава лимфоцитов селезенки, изотипический состав специфических антител к белкам-компонентам препарата, продолжительность антительного ответа;
- 4) оценить протективную активность в опытах активной защиты мышей.

Научная новизна. Впервые доказаны безопасность, переносимость и протективная активность комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa*, о чем свидетельствовали отсутствие токсичности, пирогенности, патологического действия на иммунную систему (сенсibilизации к гетерологическим антигенам), алергизирующих свойств и повышение в 2,9-3,4 раза резистентности мышей к внутрибрюшинному заражению *P. aeruginosa*.

Выявлено действие комплекса рекомбинантных белков *P. aeruginosa* на эффекторы врожденного иммунитета у мышей, выражающееся в усилении фагоцитарной и бактерицидной активности лейкоцитов в 1,5–2,3 раза, стимуляции синтеза цитокинов, играющих роль в индукции иммунного ответа по Th1, Th2 и Th17-путям и развитии реакций воспаления, с выраженным повышением уровня IL-17 (до 248 раз по сравнению с контролем).

Установлено (*in vitro*) стимулирующее влияние препарата на созревание дендритных клеток: увеличение в популяции доли клеток с экспрессией маркера клеточной адгезии CD38 в 2,8 раз, терминальной дифференцировки CD83 в 8 раз, молекул антигенной презентации МНС II в 3,3 раза, костимулирующих молекул CD80 и CD86 в 2,1 и 4,9 раз, соответственно. Зрелые дендритные клетки обладали способностью к синтезу широкого спектра цитокинов (Th1/Th2/Th17) и хемокинов (CXCL1, CCL3, CCL4, CCL5), при этом показано повышение их концентрации в среде культивирования от 2 до 210 раз по сравнению с контролем.

Показано влияние препарата на формирование адаптивного иммунного ответа с продукцией специфических антител IgG класса всех субизотипов к OprF и анатоксину с преобладанием субизотипа IgG1; изменением иммунофенотипа лимфоцитов селезенки за счет увеличения доли Т-хелперов (CD4⁺) в 1,25 раза, В-лимфоцитов (CD19⁺) – в 2,3 раза, сокращения числа Т-киллеров (CD8⁺); увеличения экспрессии Fc-рецепторов, регуляторной молекулы CD5, маркеров активации CD25 и МНС II.

Теоретическая значимость исследования: полученные данные об особенностях иммунного ответа на введение комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa* расширяют знания в области фундаментальных наук – иммунологии, микробиологии и вакцинологии. Вовлечение эффекторов врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы объясняет механизм формирования протективного эффекта совместного введения бактериальных

рекомбинантных белков, что открывает перспективу использования их для разработки иммунобиологических препаратов.

Практическая значимость исследования: установлена безопасность комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* для животных, что позволяет рекомендовать препарат к дальнейшим доклиническим и клиническим испытаниям.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Комплекс рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* соответствует требованиям безопасности, предъявляемым к иммунобиологическим препаратам.

2. Комплекс рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* активизирует факторы врожденного иммунитета: усиливает фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов, секрецию цитокинов иммунокомпетентными клетками *in vivo*, индуцирует созревание дендритных клеток *in vitro* с продукцией широкого спектра цитокинов.

3. Комплекс рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* способствует формированию адаптивного иммунитета: индуцирует секрецию специфических антител классов IgM, IgG и его субизотипов, сохраняющихся на протяжении 12 недель (период наблюдения), изменению клеточного состава селезенки (нарастание доли Т-хелперов, В-лимфоцитов, клеток с маркерами активации, снижение доли Т-киллеров) и паттерна секреции ими цитокинов при стимуляции фитогемагглютинином.

4. Комплекс рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* обладает протективной активностью, проявляющейся в повышении резистентности мышей к заражению *Pseudomonas aeruginosa*.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 19 работ, из них 10 статей в журналах из списка ВАК.

Структура и объём работы

Диссертация изложена на 146 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав, содержащих результаты собственных исследований, заключения, выводов и рекомендаций и списка использованной литературы, содержащего 289 источников (из них – 26 отечественных и 263 зарубежных авторов). Материал диссертации содержит 27 таблиц, иллюстрирован 4 рисунками.

Личный вклад автора в проведенное исследование:

состоит в анализе научной литературы по исследуемой теме, планировании и выполнении экспериментов, анализе и статистической обработке полученных данных, подготовке материалов публикаций по теме диссертации.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*: особенности жизнедеятельности

Грамотрицательная бактерия *Pseudomonas aeruginosa*, относящаяся к семейству *Pseudomonadaceae*, является условным патогеном человека. Микрорганизм имеет важное медицинское значение вследствие своей убиквитарности, антибиотикорезистентности и способности вызывать широкий спектр инфекций, в том числе тяжелых и жизнеугрожающих, у ослабленных людей [58].

Штаммы *P. aeruginosa* имеют крупные геномы (~5–7 мегабаз), содержащие большое количество регуляторных генов и сетей, являющихся основой для реагирования и адаптации к различным условиям окружающей среды; помимо этого, геном этой бактерии высокопластичен и способен к инкорпорации и модификации ДНК [76, 95, 162, 251].

Наиболее важным условием существования *P. aeruginosa* является влажность, в остальном она неприхотлива и способна месяцами сохранять жизнеспособность в дистиллированной воде, а также расти в среде с малыми концентрациями питательных веществ, при температуре 10–42 °С [37, 203]. Метаболические возможности *P. aeruginosa* обширны, о чем свидетельствует способность этой бактерии использовать в качестве нутриентов различные вещества, продуцировать множество вторичных метаболитов и полимеров, а также использовать различные источники углерода и акцепторы электронов [95]. В присутствии нитратов, как акцепторов электронов, она может расти в анаэробных условиях [140, 203].

Бактерия проявляет свойства сапрофита и широко распространена в окружающей среде, в частности, встречается в почве, воде, на растениях и в подобных природных средах обитания, и может, не вызывая болезни, колонизировать организм человека и животных [257]. Для нее присущ широкий спектр хозяев, относящихся к различным царствам живого мира.

P. aeruginosa довольно часто встречается в госпитальных условиях [43, 214], преимущественно населяя различные влажные места, например, ваннные комнаты, предметы, контактирующие с водой и т.д. [182, 203].

Повсеместное присутствие *P. aeruginosa*, а также ее распространенность и стойкость в клинических условиях, включая резистентность к терапевтическим средствам, объясняются ее необычайной способностью к выживанию за счет арсенала механизмов адаптации [95, 182, 195].

Синегнойная палочка обладает факторами вирулентности различных типов, включая токсины (экзотоксин А, рамнолипиды, токсины системы секреции III типа и др.), пили, флагеллы, литические ферменты, железосвязывающие белки, экзополисахариды, свойство формировать биопленки и другие. [182]

P. aeruginosa может претерпевать фенотипические изменения в зависимости от условий среды. Изоляты, выделенные у больных с острыми инфекциями, экспрессируют множество факторов патогенности, в то время как у штаммов, выделенных от хронических больных (прежде всего, муковисцидозом) механизмы вирулентности бывают экспрессированы слабо, зато они проявляют слизистый фенотип со сверхэкспрессией альгината и образованием биопленок [102]. Также отмечаются фенотипическая микрогетерогенность в генетически идентичных популяциях, обеспечивающая дополнительную устойчивость к изменениям окружающей среды [229]. Помимо этого, возможно присутствие нескольких генотипически различных вариантов возбудителя в одном организме хозяина [137].

Благодаря системам чувства кворума синегнойная палочка способна согласованно реагировать на меняющиеся условия среды, регулируя подвижность, образование биопленок, механизмы устойчивости к иммунитету и антибиотикам, выделение ферментов и токсинов, поглощение железа и другие функции [115, 146, 182, 200, 236, 258].

Важным свойством *P. aeruginosa* является способность формировать биопленки на биотических и абиотических поверхностях, в которых бактерии заключены в защищающую их среду из полисахаридов (альгината, Psl, Pel), ДНК

и ряда других компонентов. Биопленки повышают толерантность к ряду стрессовых факторов окружающей среды и хозяина: к фагоцитозу, действию антител, окислительному стрессу, недостатку нутриентов и кислорода, накоплению метаболитов, межвидовой конкуренции и антимикробным агентам [102, 135].

Резюмируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что *P. aeruginosa* использует два основных механизма преодоления иммунного ответа: первый – продукция разнообразных токсинов и ферментов; второй – переход к жизни в биопленке, формирующей барьер против антител, фагоцитов, комплемента и других факторов [136, 152, 155, 195].

1.2. Факторы риска и особенности патогенеза синегнойной инфекции

Несмотря на повсеместное присутствие этой бактерии в окружающей среде, иммунная система здорового человека способна предотвращать инфицирование [229].

Факторами риска инфекции служат нарушение анатомических барьеров организма (раны, ожоги, хирургические операции, искусственная вентиляция легких), ослабление иммунитета (иммуносупрессивная терапия, СПИД, различные другие иммунодефициты) и муковисцидоз. Среди дефектов иммунитета наибольшее значение имеет нейтропения. Синегнойные инфекции часто встречаются у людей пожилого возраста, страдающих различными хроническими соматическими заболеваниями [32, 33, 106, 169, 203, 213].

В медицине *P. aeruginosa* в основном имеет значение внутрибольничного патогена, однако заражение может происходить и внебольнично. Источником *P. aeruginosa* в медицинских учреждениях, особенно в отделениях интенсивной терапии, служат различные инвазивные процедуры (хирургические вмешательства, искусственная вентиляция легких) [32, 33, 102].

Помимо штаммов *P. aeruginosa*, составляющих естественную микрофлору окружающей среды, существуют штаммы, ассоциированные с внутрибольничными

инфекциями и муковисцидозом, как правило, обладающие широкой антибиотикорезистентностью. Они могут передаваться от человека к человеку посредством различных контаминированных предметов и даже воздушно-капельным путем [137, 178].

Распространенность колонизации варьирует в пределах от 3–5% у здоровых людей до 20% среди пациентов стационаров; *P. aeruginosa* вызывает около 10% внутрибольничных инфекций [181].

P. aeruginosa может вызывать острые и хронические инфекции, локальные и системные (осложненные бактериемией). Входными воротами инфекции обычно становятся дыхательные пути или различные повреждения тканей: ожоги, ранения, диабетическая стопа, попадание воды в наружный слуховой проход, использование контактных линз. Важным фактором риска служат различные хирургические вмешательства и медицинские манипуляции, такие как катетеризация мочевого пузыря, искусственная вентиляция легких и другие [32, 33, 102].

Важным фактором, приводящим к формированию хронических инфекций, является способность микроорганизма формировать биопленки [125, 221, 255].

Эта бактерия особенно приспособлена к дыхательным путям человека, являясь основной причиной заболевания легких у пациентов с муковисцидозом и одной из важнейших причин пневмонии, ассоциированной с ИВЛ [203].

Хроническая колонизация дыхательных путей *P. aeruginosa* распространена среди пациентов с некоторыми хроническими заболеваниями легких, такими как муковисцидоз и бронхоэктазы.

Муковисцидоз является распространенным генетическим заболеванием, при котором мутации в анионном канале регулятора трансмембранной проводимости (CFTR, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) нарушают нормальный транспорт ионов и жидкости через эпителий дыхательных путей, приводят к образованию густой слизи, нарушению мукоцилиарного клиренса, усилению адгезии бактерий и воспалению, что в конечном счете вызывает дыхательную недостаточность и смерть [213]. У пациентов с муковисцидозом

неэффективность механизмов удаления *P. aeruginosa* способствует ее сохранению в слизистой оболочке дыхательных путей и переходу к хроническому течению инфекции, при этом бактерия проходит ряд изменений (в основном связанных с формированием биопленок), повышающих ее устойчивость к иммунитету человека [125, 134].

Несмотря на то, что легкие при муковисцидозе подвержены полимикробным инфекциям, *P. aeruginosa* является одним из основных патогенов, инфицирующим большую часть пациентов. *P. aeruginosa* заражает пациентов с муковисцидозом в раннем возрасте и становится персистирующим патогеном в последующие годы. Зачастую сначала носительство бессимптомно, но впоследствии становится причиной выраженного повреждения легких, что совпадает с переходом бактерии к мукоидному фенотипу. Для людей, страдающих муковисцидозом, инфекция *P. aeruginosa* является наиболее важной причиной инфекционных осложнений и основным предиктором смертности [181]. Показано, что существуют характерные для муковисцидоза штаммы, многие из которых – эпидемические и передаются от одного больного муковисцидозом другому; им присуща значительная устойчивость к антибиотикам [195].

Считается, что преобладание *P. aeruginosa* в легких больных муковисцидозом является многофакторным и в основном связано с потерей функционального CFTR. При этом эпителиальные клетки дыхательных путей имеют пониженную барьерную функцию в результате отсутствия мукоцилиарного клиренса, в основном из-за CFTR-опосредованного дисбаланса в уровнях бикарбоната. Потеря нормальной функции хлоридного канала в эпителии дыхательных путей и связанные с этим дефекты транспорта натрия и воды приводят к обезвоживанию секрета дыхательных путей и закупорке слизию бронхиол [224, 269].

Слой обезвоженной слизи, состоящий из компактных липких муцинов, и потеря мукоцилиарного клиренса способствуют приобретению характерного фенотипа *P. aeruginosa*, включающего потерю подвижности, образование биопленки, повышенную секрецию альгината, микроаэрофильный/анаэробный

метаболизм и устойчивость к антибиотикам и антимикробным пептидам; слизь при муковисцидозе способствует усиленной адгезии бактерий к ней и биопленкообразованию [224, 269].

Гуморальный иммунный ответ на *P. aeruginosa* при муковисцидозе отличается неэффективностью: несмотря на обилие антител, преимущественно к липополисахариду, они имеют низкую аффинность к антигенам и не способны индуцировать опсонофагоцитоз, более того, они даже оказывают ингибирующее действие на этот процесс [166].

Нейтрофилы при муковисцидозе, по-видимому, также являются функционально дефектными: показано, что у них снижена эффективность внутриклеточного уничтожения *P. aeruginosa*, изменены уровни электролитов в цитоплазме, нарушена дегрануляция. При этом, вне легкого, нарушения нейтрофильной функции практически не проявляются, возможно, за счет того, что они преодолеваются другими компенсаторными механизмами; известно, что при муковисцидозе функциональная способность нейтрофилов дыхательных путей отличается от таковой у нейтрофилов крови [213]. Дефект CFTR изменяет транспорт ионов хлора и тем самым выводит из строя один из механизмов киллинга бактерий, основанный на синтезе хлорноватистой кислоты в фаголизосомах [79, 192]. Функция моноцитов также нарушается [52, 261].

P. aeruginosa из биопленок при муковисцидозе также имеют повышенную резистентность к уничтожению нейтрофилами с помощью нетоза [285].

Терапия инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, крайне затруднена вследствие резистентности возбудителя к антибиотикам. *P. aeruginosa* врожденно устойчива к некоторым классам антибиотиков и является одной из самых распространенных бактерий, обладающих способностью приобретать мультирезистентность посредством различных молекулярных механизмов [33, 46, 48, 218].

Механизмы антибиотикоустойчивости можно разделить на врожденные (высокая селективность трансмембранного транспорта, обеспечиваемая поринами, эффлюксные насосы, удаляющие токсины из клетки, экспрессия β -

лактамаз), приобретенные (мутации генов, кодирующих мишени антибиотиков, горизонтальный перенос плазмид резистентности) и адаптивные (различные индуцибельные фенотипические изменения) [33, 46, 48, 218]. Механизмы резистентности к антибиотикам находятся под контролем чувства кворума [182].

Доля мультирезистентных изолятов, в том числе – с широкой лекарственной устойчивостью, в клинической практике велика и продолжает расти. В этих условиях применение традиционной антибактериальной терапии становится неэффективным, а подбор препаратов, способных подавлять рост *P. aeruginosa* – сложным и долгим [33, 48, 178, 220].

Биопленкообразование, особенно характерное для хронических инфекций, дополнительно увеличивает резистентность бактерии к антибиотикам, затрудняя их диффузию в среде; оно запускается под действием антибиотиков в субингибирующих концентрациях [48, 106].

Подводя итог, следует отметить, что *P. aeruginosa* имеет богатый арсенал средств, помогающих ей выживать во внешней среде и инфицировать организм человека. Механизмы, с помощью которых иммунная система человека борется с ним, интенсивно исследуются в настоящее время, поскольку их знание помогает разрабатывать новые способы профилактики и лечения инфекций *P. aeruginosa*.

1.3. Особенности иммунного ответа при инфекции P. aeruginosa и иммунологические принципы разработки вакцин против нее

Иммунный ответ на патогенный микроорганизм включает различные эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета, действующие взаимосвязанно и в определенной временной последовательности.

На первых этапах иммунного ответа действуют механизмы врожденного иммунитета, направленные на уничтожение *P. aeruginosa* до того, как включатся механизмы адаптивного ответа, предотвращение инвазии бактерий в ткани организма и их колонизации. Они включают продукцию воспалительных

цитокинов, рекрутирование клеток в очаг воспаления и фагоцитоз бактерии нейтрофилами и макрофагами [155, 167].

В свою очередь, поглощение *P. aeruginosa* антиген-представляющими клетками и выделение цитокинов запускает адаптивный иммунный ответ, основанный на В- и Т-лимфоцитах.

Показано, что клетки *Pseudomonas aeruginosa* в основном уничтожаются путем фагоцитоза, преимущественно нейтрофилами [155, 213]. Имеет значение как опсонический, так и неопсонический фагоцитоз, притом этот последний является важнейшим механизмом иммунитета на начальных стадиях инфекции [155].

Установлено, что *P. aeruginosa* зачастую резистентна к бактерицидному действию сыворотки. Однако иммунная сыворотка, неспособная самостоятельно уничтожать бактерию, способствует ее фагоцитозу, усиливая его на 1-2 порядка. При этом для опсонизации требуются как антитела, так и комплемент [59, 155, 282, 283].

Уничтожение гранулоцитами *P. aeruginosa* зависит от количественного отношения бактерий и фагоцитов: чем оно меньше, тем быстрее и эффективнее происходит фагоцитоз. Таким образом, важными факторами, определяющими исход инфекции *P. aeruginosa*, являются способность быстро привлекать достаточное количество нейтрофилов и способность рекрутированных нейтрофилов убивать *P. aeruginosa*. На эти факторы влияют как состояние организма хозяина, так и бактериальные факторы патогенности [144].

Адаптивный иммунитет может усиливать эффективность фагоцитоза *P. aeruginosa* двумя способами: выработкой опсонизирующих антител (процесс, зависящий от В-клеток) и усиленным привлечением фагоцитов в очаг воспаления (процесс, контролируемый особой популяцией Т-хелперов – Th17-клетками) [169].

Th17-клетки представляют собой отдельную линию Т-хелперов, которые в основном продуцируют цитокины IL-17A, IL-17F и IL-22, усиливающие рекрутирование фагоцитов в очаг воспаления [164]. Th17-клетки, помимо

привлечения гранулоцитов, также индуцируют синтез различных антибактериальных пептидов [36, 124, 271]. Дифференцировка Т-клеток в подтип Th17 происходит в присутствии TGF- β и воспалительных цитокинов, таких как IL-6 и IL-1, а IL-23 поддерживает их функционирование и выработку IL-17A [80, 164].

Образование специфических по отношению к *P. aeruginosa* Th17-лимфоцитов является одним из механизмов, обеспечивающих протективный эффект. В эксперименте иммунизация мышей живым аттенуированным штаммом *P. aeruginosa* формировала защиту против гетерологичных по серотипу штаммов бактерии. При этом наблюдалось образование пула Th17-лимфоцитов, способных к пролиферации и выделению IL-17 при контакте с *P. aeruginosa*, активация которых приводила к быстрому привлечению нейтрофилов в очаг инфекции [54, 207]. Аналогичным образом действуют некоторые белки *P. aeruginosa* [275]. Протективный эффект Th17 CD4⁺ Т-лимфоцитов, превышающий эффект антител, был показан на примере убитой рентгеновскими лучами цельноклеточной вакцины против *P. aeruginosa* [150].

Установлено, что у больных муковисцидозом по сравнению со здоровыми людьми в лимфатических узлах и ткани легких больше Th17-лимфоцитов, пролиферация которых индуцировалась антигенами *P. aeruginosa*, в их числе были выявлены и Th17-клетки памяти [53].

Впрочем, на ранних этапах могут иметь большее значение «естественные» CD4⁺ IL-17-секретирующие клетки, которые преобладают в этой фазе инфекции *P. aeruginosa*. Эти клетки, в отличие от обычных Th17-клеток, которые требуют антигенного праймирования, могут быть мобилизованы за часы или дни [245].

Интерлейкин IL-17, секрецией которого характеризуется этот тип клеток, представляет собой семейство цитокинов, имеющее несколько различных подтипов. В настоящее время известны 6 вариантов, обозначенных буквами от А до F, функции которых являются предметом научных исследований. Наиболее значим и изучен IL-17A [164, 184]. Эти провоспалительные цитокины продуцируются различными клетками иммунной системы, в числе которых Th17-

клетки, врожденные лимфоидные клетки 3 типа, $\gamma\delta$ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки и NK/NKT-клетки, а также макрофаги, тучные клетки, нейтрофилы [36, 154, 164, 194].

Показано, что IL-17A рекрутирует воспалительные клетки и при этом активирует секрецию IL-17C эпителием дыхательных путей. IL-17C, в свою очередь, увеличивает высвобождение нейтрофильных цитокинов из альвеолярного эпителия и, таким образом, усиливает воспаление. Продукция цитокина IL-17C также непосредственно индуцируется *P. aeruginosa*. Таким образом, эпителиальные клетки, активированные как патогеном, так и профессиональными иммунными клетками, способствуют местному и системному воспалению при инфекции *P. aeruginosa* [270].

IL-17 может связываться со специфическими рецепторами (IL-17R), которые экспрессируются на клетках различных типов, включая лейкоциты, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки сосудов, фибробласты и мезотелиальные клетки. Когда клетки активируются посредством передачи сигналов, опосредованной IL-17R, они продуцируют цитокины и хемокины, активирующие механизмы воспаления. Стимуляция рецептора IL-17R цитокинами IL-17A/F является критической для рекрутирования легочных нейтрофилов и защиты хозяина от грамотрицательных бактерий посредством скоординированного высвобождения СХС-хемокинов (привлекают нейтрофилы в очаг воспаления) и G-CSF (индуцирует гранулопоэз), в том числе из клеток бронхиального эпителия [168, 280].

Таким образом, IL-17 важен для защиты от легочной инфекции *P. aeruginosa* благодаря своей способности управлять ответом нейтрофилов и индукцией различных врожденных антимикробных пептидов [124], особенно в раннем иммунном ответе [276]. Показана его способность предотвращать хроническую легочную инфекцию *P. aeruginosa* у мышей [36].

Однако, по-видимому, секреция IL-17 в основном эффективна при острой инфекции, а при хронической ее значение падает. Более того, при хронической инфекции дыхательных путей усиленное воспаление, хотя и ведет к более

эффективному уничтожению бактерий, в то же время приводит к увеличению повреждения тканей [154, 245].

Аналогичной IL-17 функциональной ролью в иммунитете против *P. aeruginosa* обладают интерлейкины IL-22 и IL-23. IL-22 секретируется особым подтипом клеток Т-хелперов – Th22. Этот подтип, наряду с Th1 и Th17, индуцируется при инфекции *P. aeruginosa* [35]. Рецепторы к IL-22 имеются на поверхности эпителиальных клеток дыхательных путей, которые в ответ на стимуляцию способны выделять антимикробные пептиды. При муковисцидозе концентрация IL-22 в слизистых оболочках снижена, в том числе, из-за расщепления протеазой IV *P. aeruginosa* [35, 175]. Показано, что воспалительный ответ на *P. aeruginosa* зависит также от секреции IL-23, который, в свою очередь, усиливает выработку IL-17 и последующую локальную продукцию цитокинов и хемокинов, имеющих значение для развития воспаления. IL-23 действует в более ранние сроки синергистично с IL-1 β , привлекая нейтрофилы и усиливая секрецию IL-17 $\gamma\delta$ -Т-клетками [83, 84].

Исследования роли специфических антител в иммунитете против *P. aeruginosa* наиболее активно проводились до 90-х годов [44, 287]. У здоровых людей роль антител в резистентности к заражению *P. aeruginosa* ярко не выражена: эта бактерия преимущественно уничтожается фагоцитами, а присутствие специфических антител отмечается в крови редко [121]. Однако значительная частота инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, у пациентов с врожденными нарушениями синтеза иммуноглобулинов, показывает, что антительный ответ все же играет важную роль [85].

Чувствительность *P. aeruginosa* к опосредованному сывороткой лизису, протекающему при активации комплемента по классическому и альтернативному путям [44, 170, 233, 234, 254, 284] значительно отличается у разных ее изолятов [262], что зависит от таких факторов, как длина цепей О-антигена, секреция внеклеточной слизи и ацетилирование альгината слизи [202]. Показано, что многие штаммы этой бактерии высокорезистентны к лизису, однако антитела способны на один-два порядка усиливать опсонофагоцитоз *P. aeruginosa*

нейтрофилами, при этом опсонизация требовала участия как антител, так и комплемента [282]. Установлено, что антитела способны индуцировать опсонофагоцитоз *P. aeruginosa*, например, в опытах активной и пассивной иммунизации [207, 222, 238, 278]. Антитела без комплемента действуют при опсонофагоцитозе с меньшей эффективностью, а антитела класса IgG более эффективны, чем IgM [44].

Однако при одном из важнейших состояний, сопровождающихся вызванными этой бактерией инфекциями, — муковисцидозе, — наблюдается извращение антительного ответа, приводящее к выработке большого количества антител, обладающих низкой аффинностью и авидностью (вероятно, вследствие нарушения селекции В-лимфоцитов в условиях постоянной стимуляции антигенами синегнойной палочки), не способных эффективно индуцировать комплемент-зависимый лизис, при том с преобладанием специфических антител классов IgG2 и IgG4, плохо связывающихся с Fc-рецепторами и даже ингибирующих опсонофагоцитоз [127, 166]. Поскольку спектр, изотипический состав и уровень антител, индуцированных введением микробных антигенов *P. aeruginosa*, может существенно отличаться от приобретенного при заболевании, поэтому можно предположить, что вакцины на основе протективных антигенов возбудителя повлияют на формирование эффективного антительного ответа, способного, предотвращать колонизацию и хроническое течение синегнойной инфекции, в том числе, при муковисцидозе [166].

По мнению современных исследователей, эффективная вакцина против *P. aeruginosa* должна активировать многие иммунные механизмы [207], в том числе антительный ответ, вызывающий опсонофагоцитоз бактерий фагоцитами и нейтрализующий факторы вирулентности возбудителя, и Th17-клеточный ответ, представленный клетками памяти, способными рекрутировать и активировать фагоциты в ответ на стимуляцию антигенами *P. aeruginosa* [169], особенно в уязвимых для инфекции тканях [31].

В последнее время особое внимание уделяется Th17-иммунитету, не только по причине важности этого механизма в борьбе организма с *P. aeruginosa*, но и

благодаря тому, что он препятствует появлению нечувствительных к иммунитету мутантов при инфекции и помогает бороться с микст-инфекциями; реакция Th17-клеток памяти в привлечении фагоцитов в очаг инфекции может быть более быстрой, чем активация ответа В-клеток памяти [31, 36, 169].

Вакцинные антигены должны быть широко представлены и быть консервативными у болезнетворных штаммов микроорганизма. Эти антигены также должны экспрессироваться в концентрациях, достаточно высоких для того, чтобы несущая их бактерия подвергалась эффективному воздействию иммунной системы [169].

Действие вакцины призвано имитировать контакт организма с инфекционным агентом. Врожденная иммунная система, состоящая из макрофагов, дендритных клеток, НК-лимфоцитов и нейтрофилов, работает через рецепторы распознавания образов, обнаруживая патоген-ассоциированные молекулярные структуры. Для активации дендритных клеток антигены должны быть ими поглощены. Эти клетки рекрутируют другие иммунные клетки в область введения и наиболее активно работают в течение приблизительно трех дней, поглощая антиген посредством эндоцитоза. Между 3 и 7 днями антигенпрезентирующие клетки помогают активировать В и Т лимфоциты, представляя антигенспецифичные пептиды. Адаптивный иммунный ответ специфичен для используемого антигена. В-клетки секретируют антитела против антигена, а цитотоксические Т-клетки убивают инфицированные клетки. В и Т-клетки могут стать клетками памяти, которые непрерывно циркулируют в крови до повторного заражения. Иммунологическая память является конечной целью вакцинации [97, 98].

В настоящее время придается большое значение действию вакцин на систему врожденного иммунитета. Активация его эффекторов не только влияет на формирование адаптивного иммунного ответа, являющегося целью вакцинации, но и может долгосрочно изменять сам врожденный иммунитет.

Прежде считалось, что ответ врожденной иммунной системы стабилен в различных условиях, но в последние годы было показано, что ряд клеток

врожденного иммунитета способны долгосрочно изменять свои характеристики, подобно клеткам адаптивного иммунитета, что дает защиту против спектра гетерологичных патогенов, не связанную с В- или Т-лимфоцитами. В наибольшей степени это выражено у долгоживущих клеток – НК-клеток и моноцитов. Направленность эффекта зависит от характера стимула. В основе этих изменений лежат эпигенетические модификации, модуляции экспрессии паттерн-распознающих рецепторов, изменение метаболизма клетки [45, 101, 212, 223, 256].

Специфические микробные стимулы способны вызывать длительные фенотипические изменения в клетках врожденного иммунитета, которые приводят к их усиленному ответу на повторное заражение тем же или другим патогеном [227].

Таким образом, возможно создание вакцин, которые вызывают «тренировку» системы врожденного иммунитета, приводя при инфекции к увеличению неспецифического эффекторного ответа врожденных иммунных клеток и усилению (благодаря изменению функции дендритных клеток) развития адаптивного Т-клеточного ответа как на специфические, так и на неродственные (случайные) антигены. Это может быть особенно полезным при риске рецидивирующих и микст-инфекций [227].

Дендритные клетки как основные антиген-представляющие клетки играют роль связующего звена между системами врожденного и адаптивного иммунного ответа. Продукция цитокинов, особенно дендритными клетками, играет важную роль в определении типа индуцируемого эффекторного ответа Т-клеток. Например, IL-12, IFN- α и IFN- γ эффективно индуцируют Th1-иммунные ответы, IL-4 и тимусный стромальный лимфопоэтин (TSLP) – Th2, IL-1, IL-6 и TGF- β – Th17, а IL-10 и/или TGF- β приводят к дифференцировке супрессорных Treg-лимфоцитов. Паттерн секреции цитокинов, а значит, и направленность иммунного ответа может определяться лигандами, связывающимися с паттерн-распознающими рецепторами дендритных клеток. Например, стимуляция TLR4 с помощью LPS или TLR3 с помощью двухцепочечной РНК индуцирует

продукцию IL-12 и дифференциацию лимфоцитов по Th1-пути; стимуляция гетеродимеров TLR2-TLR1 усиливает продукцию IL-23, а гетеродимеров TLR2-TLR6 – продукцию IL-10 [80, 183].

Участие поверхностных TLR усиливает эндоцитоз антигенов антиген-презентирующими клетками, а внутриклеточных – созревание фагосом и процессинг антигенов. Напротив, после поглощения апоптотических телец эндосомами, не содержащими TLR, их антигены не презентуются с помощью МНС II. В целом, это показывает, что распознавание на основе TLR является ключевым механизмом, регулирующим генерацию иммунного ответа против микробных антигенов и поддержание толерантности по отношению к собственным молекулам [143].

Активация дендритных клеток через эти рецепторы способствует их миграции в дренирующие лимфатические узлы, увеличению презентации антигена Т-клеткам и выработке цитокинов, которые управляют дифференцировкой Т-клеток по специфическим эффекторным путям. При этом разные подтипы PRR дендритных клеток экспрессируют разный набор паттерн-распознающих рецепторов. Показано, что одновременная стимуляция нескольких PRR приводит к более устойчивой продукции цитокинов [183, 186].

Однако, в то время как цельноклеточные вакцины содержат различные лиганды паттерн-распознающих рецепторов, вызывающих мощный воспалительный ответ и привлечение антиген-презентирующих клеток и лимфоцитов, белковые и пептидные вакцины должны иметь в своем составе адьюванты, создающие депо антигена в месте введения и предотвращающие его деградацию, улучшая тем самым захват антиген-представляющими клетками [72, 73].

Современным направлением исследований стал поиск адьювантов, способных активировать PRR-рецепторы и влиять на направленность иммунного ответа (например, для индукции Th17-ответа предложены курдлан, полимолочногликолевая кислота в виде наночастиц, заключающих антиген, и другие [231]). Однако до сих пор наиболее используемыми в производстве вакцин

остаются соединения алюминия, гидроксид и фосфат. Точный механизм действия их не выяснен, но показано, что антиген адсорбируется на частицах адъюванта и с ними поглощается антиген-представляющими клетками, становясь доступным для них в течение более длительного времени, кроме того, они индуцируют воспаление, усиливая рекрутирование этих клеток [73, 98].

Ряд белков способны оказывать воздействие на систему врожденного иммунитета. Известны бактериальные суперантигены, иммунотоксины, а в последнее время активно изучаются экспрессируемые бактериями белковые лиганды паттерн-распознающих рецепторов, обладающие адъювантными свойствами. Они активируют TLR-рецепторы и тем самым увеличивают секрецию цитокинов и экспрессию костимулирующих молекул антиген-презентирующими клетками, усиливая тем самым антительный и/или клеточный иммунный ответ, индуцируют рекрутирование фагоцитов. Известные в настоящее время такие белки в основном относятся к флагеллинам и поринам [123, 143].

На примере ряда рекомбинантных белков *P. aeruginosa* (например, PopB, FpvA и OprL [97, 101, 275], флагеллинов [40] и пилинов [31]) показано, что они способны вызывать Th1, Th2 и Th17-зависимый ответ, особенно важный в иммунитете к этой бактерии.

Особенности иммунного ответа на белковые антигены, отражающие происходящие при этом молекулярные события, такие как активация дендритных клеток и выделение ими цитокинов, исследовались в ряде работ, посвященных различным вакцинам на основе рекомбинантных бактериальных белков [124, 179, 253], но общие закономерности ответа на белки пока не полностью изучены.

Знания об описанных выше особенностях иммунного ответа указывают пути разработки наиболее эффективных вакцинных препаратов.

1.4. Основные направления разработки вакцин против *P. aeruginosa*

При разработке современных вакцин против *P. aeruginosa* исследователи стараются добиться индукции гуморального иммунного ответа, заключающегося

в усилении опсонофагоцитоза (опсонические антитела против О-антигена, альгината, полисахарида Psl, жгутиков и OprI), нарушении работы системы секреции типа III (антитела против PcrV) и связывания OprF с IFN- γ (антивирулентные антитела к OprF), и Т-клеточных механизмов защиты, обеспечивающие секрецию IL-17 и хемокинов с привлечением фагоцитов в очаг воспаления.

Бактериальные вакцины, созданные на основе цельных клеток, аттенуированных или убитых, были созданы на заре вакцинологии и продолжают использоваться и разрабатываться до нашего времени. Вакцины на основе убитых грамотрицательных бактерий, как правило, довольно токсичны из-за наличия в составе липополисахарида [169] и защищают в основном от гомологичных по О-серотипу штаммов, но в последние годы в некоторых работах был показан эффект инактивированных фотохимическим методом [171] и рентгеновским облучением [150] вакцин против *P. aeruginosa*, обеспечивающих серотип-гетерологичный иммунитет благодаря индукции Th17-ответа.

Также в последние годы велись разработки живых аттенуированных вакцин против *P. aeruginosa*, индуцирующих иммунитет, схожий с естественным, отличающийся индукцией иммунитета по Th17-пути, активирующего фагоцитоз нейтрофилами и макрофагами, и защитой от серотип-гетерологичных штаммов [49, 120, 131, 132, 208].

Другой подход – создание субъединичных вакцин на основе отдельных антигенов. Антигенная структура *P. aeruginosa* разнообразна. Антигены бактерии можно классифицировать как по их локализации в клетке, так и по химической природе (они могут представлять собой полисахариды, белки, а также липиды, нуклеиновые кислоты и соединения, сочетающие в своей структуре черты различных классов веществ, такие как гликопротеины).

Рассматривая антигенную структуру по первому признаку, следует отметить, что наиболее значимы для иммунитета поверхностные антигены, локализующиеся во флагеллах, пиях, внешней мембране бактерии и внеклеточной слизи. Секретируемые антигены, такие как экзотоксин А и

протеазы, также иммуногенны и, будучи факторами патогенности, могут быть мишенью для антител. Особенно в этом отношении важен экзотоксин А. Антитоксические антитела к нему хорошо изучены, оказывают протективное действие и защищают от различных штаммов *P. aeruginosa* [94, 116, 126, 159, 173, 201, 210].

Другие внеклеточные антигены содержатся во внеклеточной слизи *P. aeruginosa*: альгинат, основной компонент биопленок, а также Psl и Pel [63, 196]. Внеклеточные полисахариды исследуются в качестве вакцинных антигенов. Возможно образование опсонических антител к ним, усиливающих фагоцитоз, а антитела к Psl также затрудняют адгезию бактериальных клеток [169]. Однако секреция этих полисахаридов непостоянна, что может влиять на эффективность вакцин, создаваемых на их основе. Кроме того, они слабо иммуногенны, что требует конъюгирования с белками [169, 249].

Важнейшим поверхностным антигеном является липополисахарид, однако в силу высокой токсичности, связанной с наличием в его структуре липида А, он малоприспособлен для использования в вакцинах [82]. Хотя токсичность может быть снижена внедрением его в липосомы, в качестве кандидатного вакцинного антигена в основном изучается чистый О-антиген [174]. Однако химически чистые полисахаридные антигены требуют конъюгирования с белком для усиления иммуногенности. Другие проблемы – непостоянство экспрессии О-антигена [82, 158, 204], слабая иммуногенность его протективных эпитопов [204], серотипическое разнообразие *P. aeruginosa* [139, 249], приводящее к необходимости разработки поливалентной вакцины [207]; при этом при смешивании различных О-антигенов в составе одной вакцины наблюдается ослабление иммунного ответа на каждый отдельный компонент [112, 207].

В антигенной структуре *P. aeruginosa*, как и других бактерий, важную роль занимают белки, из которых перспективны поверхностные и секретлируемые, как наиболее доступные для взаимодействия с иммунной системой. Исследования белковых антигенов *P. aeruginosa*, в том числе в контексте разработки вакцин, ведутся с 70-80-х годов прошлого века.

Преимуществом вакцин на основе белков и пептидов является отсутствие риска реверсии патогенности (по сравнению с живыми вакцинами) и снижение риска побочных эффектов (по сравнению с цельноклеточными убитыми) [243]. Создание субъединичных вакцин на основе рекомбинантных белков – распространенная практика в современной вакцинологии. Из широко применяемых в клинической практике известны вакцина против гепатита В на основе гликопротеина HbsAg и бесклеточная коклюшная вакцина. Усилия науки направлены на замену старых вакцин новыми, более безопасными, эффективными, захватывающими больше серотипов или штаммов. С помощью генно-инженерных методов возможно создание химерных белков на основе наиболее иммуногенных и протективных эпитопов или антигенов одного и того же возбудителя; такая специфичность снижает риск побочных реакций, но выбор антигена становится сложной задачей [59, 259].

Важной проблемой является относительно низкая иммуногенность рекомбинантных белков и пептидов по сравнению с цельноклеточными вакцинами. Иммуногенность белков зависит от филогенетической дистанции, молекулярной массы, плотности эпитопов, ряда свойств химического состава, склонности к деградации [232]. Для того, чтобы быть иммуногенным, антиген должен сохраняться в месте введения, захватываться антигенпредставляющими клетками и переноситься ими в лимфатические узлы, расщепляться внутри этих клеток и связываться с молекулами главного комплекса гистосовместимости [98, 190, 279]. Показано, что иммунизация комплексными препаратами из нескольких белков вызывает больший протективный эффект, чем отдельными белками [42].

Профиль экспрессии бактериальных белков, а значит, и антигенная структура возбудителя, может меняться в зависимости изменений условий окружающей среды, что служит еще одним важным фактором, определяющим выбор антигенов при разработке белковых и пептидных вакцин [243].

В качестве вакцинных антигенов рассматриваются следующие группы белков *P. aeruginosa* [169, 174, 240]:

1) секретируемые (экзотоксин А, протеазы) – антитела к ним нейтрализуют токсические эффекты, но малоэффективны в усилении клиренса бактерий;

2) компоненты системы секреции III типа (PcrV, PopB и др.). Антитела против них способны блокировать функции системы, уменьшая цитотоксическое действие, воспаление и умеренно усиливая поглощение фагоцитами. Отмечается серологическая вариабельность PcrV. PopB индуцирует Th17-ответ [189, 278];

3) белки наружной мембраны (Opr) – высококонсервативны, вакцины на их основе нарушают функции бактерий и способствуют опсонофагоцитозу; существует возможность отбора резистентных штаммов; антитела против OprF в основном препятствуют связыванию с интерфероном, к OprI – оказывают опсонизирующее действие; OprL индуцирует Th17-ответ [97];

4) пилины – высокоиммуногенны, но гетерогенны, а их иммуногенные эпитопы не всегда доступны для связывания антител. Исследуются PilA, индуцирующий Th2-ответ, и PilQ, индуцирующий Th17-ответ;

5) флагеллины – способны активировать TLR5-рецепторы, но умеренно гетерогенны и не всегда экспрессируются бактерией; антитела усиливают опсонофагоцитоз [110, 120, 240];

6) другие белки, в том числе неохарактеризованные; например, периплазматический белок HitA [86], рецепторы к пиовердину и пиохелину FptA и FpvA [239, 275].

Эти белки могут применяться в различных сочетаниях и быть конъюгированы с полисахаридными антигенами (О-антиген, альгинат), что определяет довольно значительное разнообразие современных кандидатных вакцин против *P. aeruginosa*.

В последнее время важным направлением поиска вакцинных антигенов стало применение обратной вакцинологии, новых методов анализа *in silico*, основанных на анализе генома, протеома и структуры белков. Таким образом предсказывают как потенциальные белки – кандидатные вакцинные антигены, так и отдельные иммуногенные эпитопы этих белков, вычисляя предполагаемую

иммуногенность и представленность антигенов и выбирая из них наиболее перспективные [243].

Поиску кандидатных антигенов *P. aeruginosa* этими методами посвящен ряд недавних работ [87, 153, 216, 243]: например, в работе Rashid et al. [238] в качестве перспективных вакцинных антигенов были выделены поверхностные компоненты систем эффлюкса антибиотиков (Q9HY88, PA2837), компоненты пути chaperonusher (CupC2, CupB3), пенициллин-связывающий белок клеточной стенки бактерий (PBP1a/mrcA), внеклеточный компонент секреторной системы III типа PscC и три секреторных белка (PA0629, PA2822, PA0978); Montor et al. [180] – флагеллин, экзотоксин А, эластаза, щелочная протеаза, OprI, OprH2, OprE и OprF; Bianconi et al. [42] – 52 антигена, из которых половина не известных науке, при этом часть из них была протестирована экспериментально, и были получены несколько обладающих протективными свойствами комбинаций еще не изученных белков; Liu et al. [153] признали наиболее перспективным OprH.

Важная группа поверхностных антигенов *P. aeruginosa* – белки наружной мембраны [243, 264]. Современные исследования показали, что такие белки являются перспективными вакцинными антигенами для различных грамотрицательных бактерий, в том числе *Burkholderia pseudomallei*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio cholerae* и *Chlamydia trachomatis* [216].

Белки наружной мембраны *P. aeruginosa* различаются по своей массе, функциям, представленности на мембране, иммуногенности. *P. aeruginosa* имеет 158 белков наружной мембраны, хотя их представленность и функции изучены недостаточно [180]; многие из них высококонсервативны [56]. Исследования этих белков начались в 1970-е годы [250], несколько позже стали исследовать их иммунологические свойства [92, 114, 188, 264]; было выявлено, что антитела к ним образуются при инфекции *P. aeruginosa* [108], некоторые из этих белков показали протективную активность при иммунизации [249].

Основными преимуществами белков наружной мембраны являются высокая иммуногенность, серотип-независимость, способность индуцировать синтез опсонических и антивирулентных антител и вызывать Т-клеточный ответ, в том

числе и Th17-ответ [169]. Основными антигенами кандидатных вакцин в этом направлении исследований были OprF и OprI [267], OprH [153], OprL [3, 101, 275].

В лаборатории протективных антигенов НИИВС им. И.И. Мечникова с 70-х годов прошлого века проводились исследования белков клеточной стенки *P. aeruginosa*, а также разрабатывались бесклеточные субъединичные вакцины против этой бактерии. Получены препараты из культуры *P. aeruginosa* с помощью методов водно-солевой экстракции, солевого фракционирования и жидкостной хроматографии, содержащие преимущественно белки определенной молекулярной массы [7, 19, 246, 247, 248, 249].

Поскольку массовая доля белков наружной мембраны в бактериальной клетке довольно мала, получение вакцин на их основе путем выделения белков из естественного источника сопряжено со значительными трудностями. Получение рекомбинантных белков (путем экспрессии их, например, в клетках *Escherichia coli*) имеет значительные преимущества благодаря большому выходу целевого продукта и легкости его очистки, кроме того, технология получения не требует культивирования патогенных бактерий, а высокоочищенные индивидуальные белки удобны для изучения.

Одним из важнейших антигенов этой группы является OprF (outer membrane protein F), один из основных белков наружной мембраны *P. aeruginosa*, порин, выполняющий разнообразные функции: транспортную, структурную (связь наружной мембраны с пептидогликаном), адгезию к клеткам организма хозяина [29, 96], другим бактериям *P. aeruginosa* и к межклеточному матриксу биопленки (через полисахарид Psl), формирование микровезикул [53, 219]; он необходим для образования биопленок в анаэробных условиях [281]. Используя белок OprF для рецепции выделяемого лейкоцитами IFN- γ , синегнойная палочка способна реагировать на воздействие иммунной системы человека, активируя механизмы чувства кворума и усиливая синтез факторов вирулентности, таких, как экзотоксин А [93, 227, 274]. OprF участвует в функционировании выделяющей токсины системы секреции III типа и требуется для внутриклеточного выживания бактерии внутри макрофагов и «бегства» из фагосомы [100, 177]. Таким образом,

OprF является важным фактором вирулентности [47, 93, 142]. Установлено, что связывание OprF антителами может нейтрализовывать его эффекты как фактора вирулентности [81, 240].

Этот белок высококонсервативен и имеет высокий уровень экспрессии среди различных штаммов *P. aeruginosa* [133]. Экспрессия его регулируется бактерией, в частности, при росте в биопленке она резко возрастает [281]. Он является высокоиммуногенным [50], связывается компонентом комплемента C3 [176] и белком SAA [109], стимулирует выделение цитокинов дендритными клетками [199]. Важным механизмом иммунного ответа на *P. aeruginosa* является действие нейтрофильной эластазы на OprF, приводящее к разрушению микробной клетки [118, 144]. Показано, что при хронической инфекции *P. aeruginosa* Т-клеточный ответ на OprF снижен, в то время как антительный ответ и ответ врожденного иммунитета интенсивный, хотя направление причинно-следственной связи неизвестно [211].

OprF и его антигенные детерминанты являются компонентами различных кандидатных вакцин: так, например, разрабатываются вакцины на основе различных вариантов рекомбинантного белка OprF [8, 9, 16, 17, 34, 45, 103, 104, 105, 111, 138, 151, 160, 165, 206, 263, 266, 268 и др.], а также ДНК-вакцины на основе кодирующих OprF последовательностей [205, 286], экспрессирующих его вирусов [141, 272], бактерий [28, 288], терапия связывающимися с этим белком пептидами [136].

Эффективный иммунный ответ должен быть направлен на различные антигены возбудителя, на различные механизмы его патогенеза, поэтому имеет смысл направить действие вакцины не только на мембранный белок OprF, но и на один из секретируемых токсинов, обладающих достаточной иммуногенностью и консервативностью: например, на экзотоксин А, продуцируемый большинством клинических изолятов *P. aeruginosa* [126, 135].

Иммунизация против экзотоксина А – еще одно из важных направлений иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекций *P. aeruginosa* [116, 159].

Экзотоксин А, АДФ-рибозилирующий токсин, белок с ферментативной

активностью, сходный по действию с дифтерийным токсином, является одним из важнейших токсинов *P. aeruginosa*, секретируемым во внеклеточное пространство через систему секреции II типа. На поверхности эукариотических клеток он связывается с рецептором CD91, а затем, используя ряд сигнальных путей, проникает в цитозоль. Там этот токсин ингибирует синтез белков на рибосомах рибозилированием фактора элонгации EF-2 [173]. Такое ингибирование синтеза белка нарушает функции клеток и даже приводит к их гибели путем апоптоза. Это токсическое действие проявляется в нарушении иммунного ответа, в частности, подавлении выделения IFN- γ , экспрессии костимулирующих молекул моноцитами и цитотоксической активности НК-клеток [172]. Хотя роль этого токсина в патогенности *P. aeruginosa* еще до конца не выяснена, исследования на животных показали летальные эффекты при применении очищенного токсина [197] и снижение вирулентности бактерии при нокауте гена *toxA* [102, 173, 203].

Патологические эффекты экзотоксина А могут быть нейтрализованы связыванием с антителами [94, 287], и для иммунизации возможно создание анатоксинов [156].

Известно, что некоторые анатоксины, в том числе производные экзотоксина А, высокоиммуногенны и способны повышать иммуногенность других антигенов в конъюгированном виде [201, 210].

По этим причинам работы над вакцинными препаратами, индуцирующими антитоксический иммунитет к экзотоксину А, ведутся с 80-х годов [55, 61, 67, 68, 69, 157, 230]. В наши дни также активно ведутся исследования по разработке аналогичных вакцин [88, 89, 90, 91, 159, 225, 252 и др.]. Зачастую это конъюгаты с полисахаридными антигенами.

В НИИВС им. И.И. Мечникова с использованием генно-инженерных методов получен ряд рекомбинантных белков *P. aeruginosa* и исследованы их иммунобиологические свойства (иммуногенность, протективная активность, превентивная активность сыворотки) [11, 12, 13, 14, 15, 23, 26], в частности, белки наружной мембраны OprF, OprL, OprI, анатоксин (атоксическая делеционная форма экзотоксина А). Наиболее выраженные защитные свойства

выявлены у OprF и анатоксина, характеризующихся консервативностью структуры и распространенностью среди клинических изолятов *P. aeruginosa*. Иммунизация лабораторных животных белком OprF [9] и анатоксином [13] показала их защитные свойства, а также протективное действие антител, полученных при иммунизации животных, в опытах пассивной защиты. Подбор оптимальных доз, кратности введения и адсорбция их на гель гидроокиси алюминия обеспечивала максимальный протективный эффект этих антигенов. Кроме того, совместное введение OprF и анатоксина выявило аддитивный эффект и послужило основанием для дальнейшего изучения иммунобиологических свойств и механизмов действия комплекса в качестве прототипа вакцины [14, 22, 25].

1.5. Заключение к обзору литературы

Обзор доступной литературы по проблеме профилактики инфекций, вызываемых *P. aeruginosa* показывает, что создание эффективной вакцины является важной научной задачей. Синегнойная палочка обладает разнообразными факторами патогенности, и для достижения наибольшей эффективности противосинегнойная вакцина должна влиять на различные механизмы иммунного ответа, такие как синтез антител и образование Th17-клеток. Индуцируемый вакциной иммунитет, в свою очередь, должен быть направлен против факторов вирулентности возбудителя. В настоящее время в мировой науке ведутся исследования по созданию кандидатных вакцин против *P. aeruginosa*, и одно из наиболее разрабатываемых направлений – создание препаратов на основе рекомбинантных белков.

Согласно предъявляемым к современным иммунобиологическим препаратам требованиям, вакцина быть ареактогенной, апирогенной, не иметь аллергизирующего действия и токсических (в том числе иммунотоксических) свойств [21]. Кроме того, при разработке вакцины целесообразно исследование особенностей и механизмов иммунного ответа, формирующегося при иммунизации.

Таким образом, анализ современной литературы подтверждает, что исследование иммунобиологических свойств комплекса рекомбинантных белков *P. aeruginosa*, включая его влияние на системы врожденного и приобретенного иммунитета, имеет большое научно-практическое значение.

Глава 2. Методология и методы исследования

2.1. Материалы

2.1.1 Препараты

1) Комплекс рекомбинантных белков, содержащий 100 мкг анатоксина и 50 мкг OprF, адсорбированных на 450 мкг геля Al(OH)₃, в объеме 1 мл раствора. Стандартной дозой препарата считали 0,5 мл.

2) Комплекс неадсорбированных рекомбинантных белков, содержащий 100 мкг анатоксина и 50 мкг OprF в объеме 1 мл раствора, без гидроксида алюминия.

3) Концентрированные препараты комплекса рекомбинантных белков, содержащие 100 мкг анатоксина и 50 мкг OprF, адсорбированные на 450 мкг геля Al(OH)₃, в объеме 0,1 мл (10-кратный), 0,02 мл (50-кратный) и 0,004 мл (250-кратный). [22]

Для опытов по исследованию острой токсичности, пирогенности, иммунотоксичности и аллергенности, использовали препараты трех опытных серий комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* и аналогичных им препаратов комплекса неадсорбированных рекомбинантных белков.

Препараты получены в лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова по технологии, описанной в работах [14, 15, 17].

Далее в тексте словом «препарат» обозначается 1-й из списка выше, если не указано обратное (остальные препараты применялись в особых случаях).

2.1.2 Подопытные животные

1) Белые беспородные мыши, массой 16-18 граммов, самки, и аналогичные мыши линии BALB/c.

2) Морские свинки, беспородные, белые и пятнистые, массой 200-250 г, самцы и самки.

3) Кролики породы «Советская шиншилла», массой 2,0-3,5 кг, самцы и самки.

Животных получали из филиалов «Андреевка» и «Электрогорский» питомника Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России и соответствовали требованиям по породе, массе и состоянию здоровья.

2.1.3 Штамм *Staphylococcus aureus* Wood 46 получен из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова и характеризовался типичными морфологическими (грамположительные кокки) и культуральными свойствами (округлые колонии с ровным краем, золотистого цвета).

Штамм *Pseudomonas aeruginosa* PA103 получен из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова и характеризовался типичными морфологическими (грамотрицательные палочки) и культуральными свойствами (округлые гладкие колонии с ровным краем, зеленого цвета на цетримидном агаре и агаре Мюллер-Хинтона, с диффузным окрашиванием среды).

2.2. Иммунизация мышей

Мышей иммунизировали внутрибрюшинно 0,5 мл комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* дважды с интервалом в две недели.

2.3. Изучение протективной активности

Мышей иммунизировали комплексом рекомбинантных белков по описанной выше схеме. Через две недели после второй иммунизации проводили опыт с заражением мышей живой культурой *P. aeruginosa* (штамм PA103).

Культуру клеток *P. aeruginosa* хранили в лиофилизированном состоянии. Для получения живой культуры ампулу вскрывали и добавляли 1 мл бульона Мюллер-Хинтона (кислотный гидролизат казеина – 17,5 г/л, вытяжка из говядины – 300,0 г/л, растворимый крахмал – 1,5 г/л), суспензию переносили в стерильную пробирку объёмом 10 мл, инкубировали в термостате 4 часа при температуре 37 °С, после чего производили посев микробиологической петлей на скошенный

1,5% агар Мюллер-Хинтона в пробирки. Культуру *P. aeruginosa* на скошенном агаре выращивали в термостате при температуре 37 °С в течение ночи.

После этого выросшие на среде колонии *P. aeruginosa* смывали стерильным 0,9% раствором NaCl и разводили до требуемой концентрации с помощью стандарта мутности на 1 млрд частиц в мл.

Мышам опытных групп вводили внутривенно суспензию *P. aeruginosa* в дозах 200, 100, 50, 25 и 12,5 млн (в объеме 0,5 мл), а мышам контрольных групп – в дозах 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 млн (в том же объеме). Использовали по 50 мышей на каждую из доз заражения.

Учет погибших животных вели в течение семи дней и рассчитывали LD₅₀ по формуле Кербера в модификации Ашмарина-Воробьева:

$$LD_{50} = 10^{\lg D_{\max} - \lg a \times \left(\sum_{i=1}^n L_i - 0,5 \right)}, \text{ где}$$

D_{\max} – максимальная доза в опыте,

a – кратность разведения дозы,

L – летальность в группе (отношение количества павших животных к числу животных в группе).

Индекс эффективности (ИЭ) вычисляли как отношение LD₅₀ бактериальных клеток *P. aeruginosa*, рассчитанное для иммунизированных мышей, к LD₅₀ в контрольной группе [1].

2.4. Забор крови и получение сыворотки

У иммунизированных и неиммунизированных мышей забирали кровь тотально методом декапитации. Полученную кровь центрифугировали в микроцентрифужных пробирках 10 минут со скоростью 8000 об/мин, сыворотку (супернатант) отбирали в чистые пробирки.

Для изучения фагоцитарной и бактерицидной активности лейкоцитов у мышей кровь собирали в гепаринизированные пробирки.

2.5. Получение и культивирование лимфоцитов селезенки мышей

У мышей вскрывали брюшную полость и извлекали селезенку. Селезенку мыши гомогенизировали в 1,5 мл среды RPMI-1640. Суспензию отбирали, далее клетки осаждали центрифугированием со скоростью 1500 об/мин при температуре 4 °С в течение 10 мин.

Далее удаляли эритроциты методом гипотонического шока: к осадку добавляли 900 мкл дистиллированной воды, ресуспендировали и перемешивали 10 секунд, затем добавляли 100 мкл 10-кратного раствора Хэнкса. После лизиса эритроцитов спленоциты осаждали центрифугированием 10 мин при 1500 об/мин и дважды отмывали средой RPMI-1640. Подсчет живых и мертвых клеток проводили в камере Горяева, используя 0,1% раствор трипанового синего в 0,9% растворе NaCl.

Для исследования фитогемагглютинин-стимулированной секреции цитокинов полученные спленоциты культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки. В часть культур добавляли фитогемагглютинин (ПанЭко, Россия) в результирующей концентрации 10 нг/мл и инкубировали в плоскодонных культуральных планшетах (Corning, США) в CO₂-инкубаторе в течение суток при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Методы исследования безопасности

Безопасность комплекса рекомбинантных белков исследовали в соответствии с Руководством по доклиническим исследованиям иммунобиологических препаратов (под ред. А.Н. Миронова, 2013 г.) [21] и XIV Государственной Фармакопеей РФ [5, 6].

2.6. Исследование острой токсичности

Проводили испытания на белых беспородных мышах массой 20-22 г, объединенных в 6 опытных и 1 контрольную группу, по 10 самцов и 10 самок в

каждой, и на беспородных морских свинках (пятнистые и альбиносы) массой 250 ± 25 г, в составе 6 экспериментальных и 7 контрольных группы по 10 самцов и 10 самок. В трех опытных группах животным вводили внутривенно одну дозу комплексного препарата объемом 0,5 мл каждой из трех опытных серий; в других трех опытных группах – те же серии препарата, но в десятикратной дозе; животным опытной группы вводили 0,9% раствор NaCl в эквивалентной дозе.

Общая продолжительность наблюдения за животными составляла 14 суток, в течение исследуемого периода ежедневно проводили клинический осмотр животного. Измеряли массу мышцей на 2-й и 15-й день после введения препарата, а морских свинок – на 7-й и 14-й день после введения.

2.7. Исследование пирогенности

Пирогенность определяли двумя методами: в опыте с введением кроликам препарата белков OprF и анатоксина, не адсорбированных на гидроксиде алюминия, и по содержанию эндотоксина в препаратах (ЛАЛ-тест).

Опыт на кроликах проводили в соответствии с указаниями XIV Фармакопеи РФ, ОФС.1.2.4.0005.15 «Пирогенность» [5]. В нем использовали кроликов породы «Советская шиншилла» массой 2-3,5 кг, 9 особей, разделенных на 3 опытные группы по 3 кролика. Перед введением препаратов дважды с интервалом в 30-40 минут измеряли температуру тела животных, контролируя, чтобы она не превышала $39,2^{\circ}\text{C}$.

Опытным животным вводили препарат неадсорбированных белков-компонентов комплекса однократно внутривенно в дозе, эквивалентной 1 прививочной дозе комплексного препарата (с гидроксидом алюминия), в объеме 0,5 мл. Кроликам 1-й группы вводили препарат из белков-компонентов, использованных для приготовления комплексного препарата 1-й серии, 2-й группы – препарата 2-й серии, 3-й группы – препарата 3-й серии.

После внутривенного введения препаратов проводили термометрию трижды: через 30, 60 и 90 минут. Показатели максимального повышения температуры тела на сроках наблюдения у кроликов суммировали, понижение

температуры тела не учитывали, считая равным нулю. Препарат считали апиrogenным, если суммарное повышение температуры тела в группе ($\sum \Delta t$) не превышало 1,2 °С, а индивидуальное повышение температуры ни у одного из кроликов не превышало 0,5 °С.

В опыте по определению количества эндотоксина проводили хромогенный ЛАЛ-тест (*Limulus amoebocyte lysate*) по методике, описанной в XIV Государственной фармакопее РФ, ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины» (Метод Е) [6]. Использовали набор для постановки ЛАЛ-теста ENDOSAFE® ENDOCHROME™ в соответствии с инструкциями производителя. Согласно ОФС «Бактериальные эндотоксины» пороговая пирогенная доза составляет 5 ЕЭ/кг в час. Поскольку предполагаемая доза для человека составляет 0,5 мл, а предполагаемая масса тела реципиентов >10 кг, пороговой пирогенной дозой для препарата считали 100 ЕЭ/мл.

2.8. Исследование иммунотоксичности

Имунотоксические свойства препарата оценивали по способности вызывать неспецифическую активацию иммунитета к неродственным антигенам в соответствии с требованиями Руководства по доклиническим исследованиям иммунобиологических препаратов (раздел 2.5).

Исследование влияния препарата на гуморальное звено иммунитета проводили в тесте определения антителообразующих клеток методом локального гемолиза в геле по Ерне [128] по способности вызывать неспецифическую поликлональную активацию лимфоцитов селезенки мышей, продуцирующих IgM к эритроцитам барана, вводимых в комплексе с препаратом.

В качестве подопытных животных использовали белых беспородных мышей массой 14-16 г.

Животные были разделены на 12 опытных и 1 контрольную группу по 10 особей. Мышам опытных групп вводили однократно внутрибрюшинно препарат в объеме 0,5 мл в следующих дозах: 1-кратная прививочная доза, 10-кратная

прививочная доза, 50-кратная прививочная доза и 250-кратная прививочная доза. 1-3 опытные группы получали однократную дозу препарата, 4-6 группы – десятикратную, 7-9 группы – пятидесятикратную, а 10-12 группы – двухсотпятидесятикратную дозу каждой из серий препарата. Мышам контрольной группы вводили 0,5 мл 0,9% раствора NaCl.

Затем через час внутрибрюшинно вводили эритроциты барана в количестве 2×10^7 клеток в объеме 0,5 мл. На 5 сутки животных умерщвляли, извлекали селезенки и определяли число антителообразующих клеток на 1 мг массы селезенки. Индекс модуляции определяли как отношение их числа в опыте к числу в контроле [128].

Исследование влияния препарата на клеточное звено иммунитета проводили с помощью стимуляции реакции гиперчувствительности замедленного типа: при введении его в комплексе с эритроцитами барана мышам, и введении его в комплексе с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) – морским свинкам [21].

В первом тесте исследования проводили на белых беспородных мышах массой 14-16 г, объединенных в шесть опытных и одну контрольную группу по 10 особей.

Мышам 1-3 опытных групп вводили однократно внутрибрюшинно 1 дозу препарата каждой опытной серии препарата в объеме 0,5 мл; 4-6 опытных групп – десятикратную дозу препарата каждой опытной серии в объеме 0,5 мл; мышам контрольной группы вводили 0,5 мл 0,9% раствора NaCl. Одновременно животным всех групп подкожно в холку вводили эритроциты барана в дозе 2×10^8 клеток и объеме 0,5 мл.

Через 5 суток вводили разрешающую дозу антигена – эритроциты барана в дозе 10^8 клеток и объеме 50 мкл в подушечку одной из задних лап, в другую заднюю лапу вводили 50 мкл стерильного 0,9% раствора NaCl. Оценку иммунотоксичности препарата проводили через 24 часа по индексу реакции гиперчувствительности замедленного типа – отношению масс опытной и контрольной конечностей.

Второй тест проводили на беспородных морских свинках массой 250-270 г, объединенных в шесть опытных и одну контрольную группу по 6 животных.

Свинкам 1-3-й опытных групп вводили однократную дозу препарата каждой из опытных серий в смеси с ПАФ в соотношении 1:1, а 2-й опытной группы – десятикратную дозу препарата каждой серии в смеси с ПАФ в соотношении – 1:1 в подушечки 4 лап, суммарный объем вводимого препарата на одно животное составил 0,5 мл. Животным контрольной группы вводили только ПАФ в подушечки 4 лап в объеме 0,5 мл.

На 21-й день опыта животным выстригали участок кожи на спине и вводили внутривенно десятикратную дозу препарата в объеме 0,2 мл, на другой участок кожи для контроля реакции вводили стерильный 0,9% раствор NaCl в равной дозе. Через 1, 24 и 48 ч после введения осматривали животных, определяя наличие реакции ГЗТ на коже, и оценивали ее в баллах от 0 до 5, далее вычисляли среднее значение по группе.

Статистический анализ результатов исследований осуществляли с определением средних величин и доверительных интервалов для уровня достоверности 95% по Фишеру-Стьюденту.

2.9. Исследование алергизирующих свойств

Для определения алергизирующих свойств препарата использовали тесты гиперчувствительности немедленного типа (тест общей анафилаксии на морских свинках) и гиперчувствительности замедленного типа (тест отека лапы на мышах) в соответствии с требованиями Руководства по доклиническим исследованиям иммунобиологических препаратов (раздел 2.6). [21].

При исследовании анафилактической активности в качестве подопытных животных использовали беспородных морских свинок (пятнистые и альбиносы) в возрасте 3 месяцев с массой тела 250-270 г, разделенных на шесть опытных и четыре контрольные группы по десять особей в каждой.

Подопытные животные были разделены на 10 групп. Свинкам первой контрольной группы вводили подкожно 0,9% раствор NaCl, а 2-4 контрольных

групп – одну дозу (0,5 мл) препарата каждой из опытных серий. Животные 1-3 опытных группы получали одну дозу препарата каждой серии, 4-6 опытных групп – десятикратную дозу препарата каждой из опытных серий (концентрированный препарат, в объеме 0,5 мл). Инъекции производили ежедневно в течение трех суток.

Через 21 день после иммунизации животным контрольных групп внутривенно вводили 0,9% раствор NaCl, а животным опытных групп – неадсорбированные рекомбинантные белки-компоненты в трехкратной дозе по отношению к содержанию в препарате антигенов, соответствующие трем опытным сериям комплекса.

Наблюдали за животными в течение 60 минут, используя следующую классификацию симптомов:

- А) повышение температуры тела более, чем на 1 °С;
- Б) выраженные частые почесывания, единичные чиханья, понижение температуры тела;
- В) спастический кашель, боковое положение животного с выделением кала и мочи;
- Г) спазм дыхательных путей, конвульсивные прыжки, судороги и гибель животного;
- Д) отсутствие реакции.

Далее вычисляли индекс синдрома анафилаксии по Weigle по формуле: $ИС = [(А \times 1) + (Б \times 2) + (В \times 3) + (Г \times 4)] : [А + Б + В + Г + Д]$.

Для оценки реакции гиперчувствительности замедленного типа использовали белых беспородных мышей массой тела 20-22 г.

Использовали три группы мышей по 10 особей, соответственно опытным сериям комплекса рекомбинантных белков. Препарат вводили по одной дозе трехкратно внутрибрюшинно с интервалом в трое суток. Через 7 суток после последней инъекции в подушечку одной из задних лап вводили одну прививочную дозу концентрированного препарата в объеме 0,05 мл, а в другую

лапу вводили 0,9% раствор NaCl в том же объеме. Уровень специфической воспалительной реакции оценивали через 24 часа по разнице в массе конечностей. Индекс реакции выражали в процентах прироста массы лапки, в которую вводили препарат, по отношению к массе контрольной лапки.

Методы исследования эффекторов врожденного иммунитета

2.10. Получение FITC-меченого *Staphylococcus aureus*

Убитую нагреванием суточную культуру *Staphylococcus aureus* в концентрации 1 млрд клеток в мл трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере, центрифугировали 10 минут со скоростью 10000 об/мин при температуре 4 °С. После трехкратной отмывки бактерии ресуспендировали в карбонатно-бикарбонатном буфере, добавляли флуоресцина изотиоцианат (ФИТЦ, FITC) в концентрации 0,1 мг/мл, инкубировали в течение ночи при 4 °С, далее трижды отмывали FITC-меченые микробные клетки от избытка несвязавшегося красителя, ресуспендируя их в ФСБ и центрифугируя 10 минут при скорости 10000 об/мин и температуре 4 °С, а затем удаляли супернатант.

Для получения живого FITC-меченого *Staphylococcus aureus* живую бактериальную культуру, после инкубации в течение 2 часов в ультразвуковой бане, окрашивали аналогичным образом.

2.11. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов в отношении *Staphylococcus aureus*

Фагоцитарную активность лейкоцитов определяли по поглотительной способности нейтрофилов и моноцитов периферической крови мышей (n=10) по отношению к убитым нагреванием микробным клеткам *S. aureus*. К 30 мкл периферической крови мышей прибавляли 30 мкл FITC-меченых бактерий *S. aureus* (в концентрации 10^9 микробных клеток/мкл) и инкубировали 30 минут при 37 °С в термостате. После этого к смеси добавляли 60 мкл лизирующего раствора OptiLyse C (Beckman Coulter, США) и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. После лизиса эритроцитов для удаления

несвязавшихся бактерий и фрагментов эритроцитов смесь переносили в цитометрические пробирки и трижды отмывали десятикратным объемом фосфатно-солевого буфера, центрифугируя при 1000 об/мин 3 мин на центрифуге ЛМС-3000 (Biosan, Латвия).

После отмывки лейкоциты ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера.

Количество нейтрофилов и моноцитов, захвативших FITC-меченые бактерии, определяли на проточном цитометре Cytomics FC-500 («Beckman Coulter», США).

Гейт клеточной популяции определяли путем оценки фронтального и бокового светорассеивания и размера клеток; в каждом гейте оценивали 10000 клеток. Клетки, флуоресцирующие в канале FL1 выше уровня отсечки (10^2), считали поглотившими бактерии. Результат представляли, как процент нейтрофилов или моноцитов, фагоцитировавших убитые нагреванием FITC-меченые бактериальные клетки *S. aureus*.

2.12. Определение бактерицидной активности лейкоцитов в отношении *Staphylococcus aureus*

Бактерицидную активность лейкоцитов крови мышей оценивали в отношении живой культуры *S. aureus*.

Из периферической крови мышей выделяли лейкоцитарную суспензию на желатине. Для этого 500 мкл гепаринизированной крови смешивали с 1 мл подогретого до температуры 37 °С 3% раствора желатина и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 30 мин. После оседания эритроцитов супернатант, содержащий лейкоциты, отбирали в 15-мл пробирки и трижды отмывали 10-кратным объемом фосфатно-солевого буфера. Затем лейкоциты центрифугированием в течение 10 мин при 1000 об/мин и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере, доводя концентрацию клеток до 10^6 клеток в мл после подсчета числа лейкоцитов в камере Горяева.

Лейкоцитарную суспензию, полученную через 4 и 24 часа после иммунизации, инкубировали в течение 1 и 3 ч с суспензией FITC-меченых живых клеток *S. aureus*.

Не поглощенные лейкоцитами микробные клетки удаляли трехкратной отмывкой в фосфатно-солевом буфере с центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин. Через 1 и 3 ч инкубации лейкоциты, захватившие живые бактерии, разрушали 10 мМ карбонатно-бикарбонатным буфером, содержащим 0,2% сапонины (Sigma, США). Погибшие внутриклеточно микробные клетки окрашивали йодидом пропидия в концентрации 2,5 мг/л в течение 15 минут.

Количество FITC-меченых бактерий, погибших при инкубации с лейкоцитами, определяли на проточном цитометре Cytomics FC-500 («Beckman Coulter», США).

Среди общей популяции клеток *S. aureus*, окрашенных FITC (зеленый флуорохром, канал FL1), определяли процент микробных клеток, окрашенных йодидом пропидия (красный флуорохром, канал FL3) и вычисляли процент убитых микробных клеток.

2.13. Культивирование дендритных клеток

Дендритные клетки получали культивированием клеток костного мозга мышей линии BALB/c. Костный мозг мышей гомогенизировали в среде RPMI – 1640 (Sigma, США), клетки трижды отмывали, ресуспендируя и осаждая центрифугированием в течение 5 мин при скорости 250g. Клетки переводили в обогащенную среду культивирования (среда RPMI-1640 с добавлением 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10 % термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки), содержащую рекомбинантные GM-CSF и IL-4 (Biosource, США) в концентрации 20 нг/мл, и доводили концентрацию клеток до 10^6 клеток в 1 мл с помощью подсчета в камере Горяева. Культивирование производили в плоскодонных культуральных планшетах (Corning, США) в CO₂-инкубаторе MCO-19AIC (Sanyo, Япония) при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

На шестые сутки культивирования производили смену среды и в культуры незрелых дендритных клеток вносили комплекс адсорбированных рекомбинантных белков *P. aeruginosa* либо неадсорбированных в объеме 15 мкл на миллилитр культуральной жидкости. В качестве классического индуктора созревания (позитивный контроль) использовали коммерческий TNF- α в концентрации 20 нг/мл (Biosource, США). Культивировали еще 3 суток и далее оценивали иммунофенотип клеток и содержание цитокинов в супернатантах.

2.14. Определение иммунофенотипа дендритных клеток

Дендритные клетки из культуры осаждали центрифугированием и отмывали фосфатно-солевым буфером. Далее к суспензии клеток добавляли моноклональные антитела к исследуемым клеточным маркерам, меченые флюорохромами. Оценку иммунофенотипа осуществляли методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США). Гейт популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 10000 клеток в гейте.

Популяцию дендритных клеток и их подтипов выделяли с применением негативной селекции по маркерам CD3, CD14, CD19 и позитивной селекции по маркерам МНСII, CD11c, CD123. Подтипы дендритных клеток периферической крови характеризовали следующим фенотипом: миелоидные дендритные клетки (CD3-CD14-CD19-МНСII+CD11c+CD123-), плазмцитойдные дендритные клетки (CD3-CD14-CD19-МНСII+CD11c-CD123+). Зрелость подтипов дендритных клеток оценивали по экспрессии на них поверхностных маркеров — CD34, CD83, CD80, CD86, МНСII. Также оценивали экспрессию рецепторов TLR2 и TLR4.

2.15. Определение уровня цитокинов

Концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей определяли тест-системой FlowCytomix Th1/Th2 Mouse 10 plex для проточной цитометрии с использованием шариков, сенсibiliзированных моноклональными антителами к

цитокинам (GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α) («BenderMedSystems», Австрия).

Уровень цитокинов в супернатантах культур дендритных клеток определяли на приборе Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader. Исследовали содержание 23 цитокинов и хемокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, Eotaxin (CCL11), G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC (CXCL1), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α , (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), TNF- α) с использованием набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, США) согласно инструкции производителя.

Методы исследования адаптивного иммунитета

2.16. Определение иммунофенотипа лимфоцитов

К суспензии клеток селезенки добавляли моноклональные антитела, меченые флюорохромом к исследуемым клеточным маркерам (в соотношении на 25 мкл материала – 3 мкл раствора антител). Инкубировали 30 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. После инкубации добавляли 60 мкл лизирующего буфера Optilyse C (Beckman Coulter, США), инкубировали 15 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Затем клетки отмывали трижды фосфатно-солевым буфером. Результаты (процент клеток, положительных по исследуемому маркеру, в популяции) учитывали на проточном цитометре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США).

При учете результатов подсчитывали 5000 клеток в гейте.

Иммунофенотип лимфоцитов селезенки определяли по маркерам CD3, CD4, CD5, CD8, CD16/32, CD19, CD25, MHC II.

2.17. Твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА) проводили с целью определения титров антител к антигенам-компонентам комплекса в исследуемых сыворотках.

1) В опыте по определению продолжительности иммунного ответа исследовали содержание суммарных антител к белкам-компонентам комплексного препарата на основе рекомбинантных белков *P. aeruginosa* в сыворотке крови мышей. На поверхность лунок плоскодонных планшеты для ИФА Nuova Aptaca 5096/p (Италия) отдельно адсорбировали растворенные в 50 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере (pH=9,4) рекомбинантные белки OprF и анатоксин в концентрации 10 мкг/мл в объеме 100 мкл на лунку. Адсорбцию производили при температуре 4 °С в течение ночи. После этого раствор удаляли, планшеты трижды промывали дистиллированной водой, высушивали при комнатной температуре в течение 12 ч и хранили при температуре 4 °С в холодильнике до недели.

Использовали двукратные серийные разведения исследуемых сывороток, начиная с 1:1000 (1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000). Разведения сывороток производили фосфатно-солевым буфером.

Вносили разведенные сыворотки по 100 мкл в лунки планшет и инкубировали при температуре 37 °С в термостатированном шейкере в течение 45 минут, после чего остатки сывороток с несвязавшимися антителами удаляли и трижды промывали планшеты, внося в лунки 200 мкл ФСБ-Т.

Далее в лунки вносили по 100 мкл раствора вторичных антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, Р-РАМ Iss (Имтек, Россия) в разведении 1:10000, инкубировали при температуре 37 °С в термостатированном шейкере в течение 45 минут и промывали вышеописанным образом.

Для проявления реакции в лунки вносили по 100 мкл однокомпонентного субстрата тетраметилбензидина (ТМВ single solution, Life Technologies, США), инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1М раствора серной кислоты. Оптическую плотность в лунках планшет определяли на планшетном фотометре Multiscan Ascent (ThermoLab Systems, США) при длине волны 450 нм.

2) В опыте по определению уровней различных классов и субклассов антител изучали содержание антител классов IgM и IgG и субклассов IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 к белкам-компонентам препарата в сыворотке крови мышей.

На плоскодонные планшеты для ИФА (Biomedicals, Россия) отдельно адсорбировали растворенные в 50 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере (pH=9,4) рекомбинантные белки OprF и анатоксин в концентрации 10 мкг/мл в объеме 100 мкл на лунку. Адсорбцию производили в течение 2 часов при температуре 37 °С в термостате, далее – при температуре 4 °С в течение ночи. После этого раствор удаляли, планшеты высушивали в термостате в течение часа при температуре 37 °С и хранили при температуре 4 °С в холодильнике.

Перед проведением эксперимента планшеты трижды промывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,05% раствор Tween 20 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ-Т) (Sigma, США), pH=7,4.

Использовали двукратные серийные разведения раствором ФСБ-Т исследуемых сывороток, начиная с 1:100 (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200, 1:102400).

Сыворотки по 100 мкл вносили в лунки планшет и инкубировали при температуре 37 °С в термостате в течение 1 ч, после чего остатки сывороток с несвязавшимися антителами удаляли и трижды промывали планшеты, внося в лунки 200 мкл ФСБ-Т.

Далее в лунки вносили по 100 мкл раствора вторичных антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Использовали следующие конъюгаты вторичных антител:

1) IgM – goat anti-mouse heavy chain secondary antibody, HRP (Thermo Fisher Scientific, США), в разведении 1:2000.

2) IgG – goat anti-mouse IgG (H+L) SuperClonal secondary antibody, HRP (Thermo Fisher Scientific, США), в разведении 1:8000.

3) IgG1 – rabbit anti-mouse γ -1-chain secondary antibody, HRP-conjugated, 610-4340 (Rockland antibodies&assays, США), разведение 1:8000.

4) IgG2a – rabbit anti-mouse γ -2a-chain secondary antibody, HRP-conjugated, 610-4341 (Rockland antibodies&assays, США), разведение 1:2000.

6) IgG2b – rabbit anti-mouse γ -2b-chain secondary antibody, HRP-conjugated, 610-4341 (Rockland antibodies&assays, США), разведение 1:2000.

5) IgG3 – rabbit anti-mouse γ -3-chain secondary antibody, HRP-conjugated, 610-4343 (Rockland antibodies&assays, США), разведение 1:2000.

Инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 1 ч, после чего растворы конъюгатов удаляли и трижды промывали планшеты, внося в лунки по 200 мкл ФСБ-Т.

Для проявления реакции в лунки вносили по 100 мкл однокомпонентного субстрата тетраметилбензидина (ТМВ single solution, Life Technologies, США), инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1М раствора серной кислоты.

Оптическую плотность в лунках планшет определяли на планшетном фотометре Biorad iMark Microplate Reader (BioRad, США) при длине волны 450 нм. В качестве контроля использовали сыворотки неиммунизированных мышей. Титром антител считали последнее разведение сыворотки, оптическая плотность которой была в два раза выше, чем в контроле.

2.18. Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Excel и «Statistica 10». Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли в рамках параметрической (по Фишеру-Стьюденту) и непараметрической базовой статистики с использованием методов Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса. Различия рассматривались как значимые при $p \leq 0,05$.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ (ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ, АЛЛЕРГЕННОСТИ, ИММУНОТОКСИЧНОСТИ) КОМПЛЕКСА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ *P. AERUGINOSA*

Разработка лекарственных средств, включая иммунобиологические, проводится поэтапно и регламентируется законодательством. При разработке вакцин на первом этапе проводятся доклинические исследования их безопасности.

В свете вышеизложенного в настоящей работе проведена проверка безопасности комплекса рекомбинантных белков *P. aeruginosa* в соответствии с Руководством по доклиническим исследованиям иммунобиологических лекарственных препаратов [21]. При проверке безопасности препарата исследованы острая токсичность (по клиническим показателям и приросту массы тела подопытных животных), пирогенность (по содержанию в ней пирогенов – бактериальных эндотоксинов и по температурной реакции кроликов), способность вызывать патологическую активацию иммунной системы и аллергические реакции.

3.1. Исследование острой токсичности

Состояние подопытных животных оценивали по ряду параметров. Во-первых, производили клинические наблюдения за животными. Препарат хорошо переносился подопытными животными, не вызывал изменений поведения и внешнего вида. Клинические признаки отравления не были выявлены ни в одной группе животных, получавших препарат. В ходе экспериментов гибель животных не была зафиксирована, поэтому расчет LD₅₀ не проводили.

Изменения потребления корма животными опытных и контрольной групп зафиксировано не было.

Результаты оценки клинического состояния животных приведены в таблице 1.

Таблица 1. Основные клинические показатели состояния здоровья подопытных животных, вне зависимости от видовой и половой принадлежности, в течение 24 часов после введения исследуемого препарата

Показатель	Контроль	Препарат 1-й серии	Препарат 2-й серии	Препарат 3-й серии
Поведение	норма	норма	норма	норма
Походка	норма	норма	норма	норма
Темперамент	норма	норма	норма	норма
Внешний вид	норма	норма	норма	норма
Состояние шерстяного покрова	норма	норма	норма	норма
Глаза	норма	норма	норма	норма
Уши	норма	норма	норма	норма
Конечности	норма	норма	норма	норма
Дыхание	норма	норма	норма	норма
Слюноотделение	норма	норма	норма	норма
Мочеиспускание	норма	норма	норма	норма

Другим оцениваемым параметром состояния подопытных животных стал прирост массы тела. Полученные данные прироста массы тела животных показаны в таблицах 2-7. Данные массы приведены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Таблица 2. Прирост массы тела у мышей-самцов, получавших однократно 1 дозу препарата, в сравнении с неиммунизированными животными

№ серии	Средняя масса животного в серии, г		Средний прирост массы животного в серии, %	
	2-й день после введения	15-й день после введения	2-й день после введения	15-й день после введения
1	21,4 ± 0,2	22,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	3,1 ± 2,2
2	21,1 ± 0,2	22,0 ± 0,2	1,4 ± 0,2	5,9 ± 0,7
3	21,0 ± 0,2	22,3 ± 0,1	0,8 ± 0,5	5,0 ± 1,0
Контроль	21,3 ± 0,3	22,4 ± 0,3	1,1 ± 0,4	3,9 ± 0,5

Таблица 3. Прирост массы тела у мышей-самок, получавших однократно 1 дозу препарата, в сравнении с неиммунизированными животными

№ серии	Средняя масса животного в серии, г (по 5 голов на серию)		Средний прирост массы животного в серии, % (по 5 голов на серию)	
	2-й день после введения	15-й день после введения	2-й день после введения	15-й день после введения
1	21,6 ± 0,2	23,0 ± 0,2	1,1 ± 0,7	5,9 ± 0,4
2	21,3 ± 0,2	22,8 ± 0,2	1,8 ± 0,5	4,8 ± 0,4
3	21,1 ± 0,3	22,7 ± 0,2	1,5 ± 0,7	5,4 ± 0,4
Контроль	21,6 ± 0,2	22,2 ± 0,3	0,7 ± 0,7	5,5 ± 0,4

Таблица 4. Прирост массы тела у мышей-самцов, получавших однократно 10 доз препарата, в сравнении с неиммунизированными животными

№ серии	Средняя масса животного в серии, г		Средний прирост массы животного в серии, %	
	2-й день после введения	15-й день после введения	2-й день после введения	15-й день после введения
1	21,3 ± 0,3	22,4 ± 0,2	1,1 ± 0,2	4,1 ± 1,2
2	21,5 ± 0,2	22,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	5,5 ± 0,4
3	21,3 ± 0,2	22,5 ± 0,1	0,9 ± 0,3	4,9 ± 0,8
Контроль	21,1 ± 0,2	22,1 ± 0,3	0,6 ± 0,4	3,7 ± 0,6

Таблица 5. Прирост массы тела у мышей-самок, получавших однократно 10 доз препарата, в сравнении с неиммунизированными животными

№ серии	Средняя масса животного в серии, г		Средний прирост массы животного в серии, %	
	2-й день после введения	15-й день после введения	2-й день после введения	15-й день после введения
1	21,4 ± 0,2	22,6 ± 0,2	1,1 ± 0,8	5,6 ± 0,5
2	21,1 ± 0,2	22,6 ± 0,2	1,6 ± 0,5	4,9 ± 0,4
3	21,1 ± 0,3	22,7 ± 0,2	1,4 ± 0,6	5,5 ± 0,5
Контроль	21,6 ± 0,2	22,9 ± 0,3	1,5 ± 0,5	5,3 ± 0,4

Таблица 6. Прирост массы тела у морских свинок-самцов, получавших однократно 10 доз препарата, в сравнении с неиммунизированными животными

№ серии	Средняя масса животного в серии, г		Средний прирост массы животного в серии, %	
	7-й день после введения	14-й день после введения	7-й день после введения	14-й день после введения
1	256,7 ± 4,1	275,7 ± 3,8	7,2 ± 0,8	15,1 ± 1,3
2	264,7 ± 3,2	282,9 ± 2,8	6,9 ± 0,6	14,3 ± 0,8
3	257,7 ± 3,9	274,2 ± 2,4	6,7 ± 0,4	14,2 ± 0,4
Контроль	249,8 ± 2,6	233,8 ± 3,6	6,9 ± 0,7	16,3 ± 0,9

Таблица 7. Прирост массы тела у морских свинок-самок, получавших однократно 10 доз препарата, в сравнении с неиммунизированными животными

№ серии	Средняя масса животного в серии, г		Средний прирост массы животного в серии, %	
	7-й день после введения	14-й день после введения	7-й день после введения	14-й день после введения
1	258,3 ± 2,3	277,3 ± 3,2	5,0 ± 0,2	12,8 ± 0,7
2	264,5 ± 2,7	288,5 ± 3,9	6,9 ± 0,5	16,6 ± 0,9
3	255,3 ± 3,3	276,3 ± 4,0	6,1 ± 0,6	14,8 ± 1,1
Контроль	254,2 ± 3,1	275,7 ± 3,6	5,6 ± 0,5	14,5 ± 1,0

Статистически значимых различий между животными, получавшими комплексный препарата на основе рекомбинантных белков *P. aeruginosa*, и животными, получавшими 0,9% раствор NaCl, по приросту массы тела ни в одной из исследуемых доз, у самцов и у самок, выявлено не было.

Таким образом, комплексный препарат на основе рекомбинантных антигенов синегнойной палочки является нетоксичным препаратом, не вызывает отклонений прироста массы тела и хорошо переносится подопытными животными.

3.2. Исследование пирогенности

Пирогенность исследовали двумя методами: на кроликах и в тесте на бактериальные эндотоксины (основные пирогены в белковых вакцинах, полученных рекомбинантным методом с помощью экспрессии в клетках *Escherichia coli*).

Собственно пирогенность, то есть способность препарата вызывать лихорадку, проверяли на кроликах в трех группах по три особи, соответственно образцу вводимого препарата. Использовали препараты комплекса неадсорбированных белков-компонентов трех опытных серий.

Введение препаратов кроликам не выявило у них пирогенных свойств (табл. 8). Исходная температура тела животных не превышала 39,2 °С, повышения температуры более чем 0,5 °С у отдельных животных и более 1,2 °С в сумме по группе не выявлено.

Таблица 8. Оценка пирогенности препаратов-комплексов рекомбинантных

белков

P. aeruginosa трех серий

Серия препарата		1-я			2-я			3-я		
№ кролика		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Масса кролика, кг		2,3	2,14	2,1	2,34	2,35	2,09	2,05	2,15	2,2
Температура тела до введения препарата, °С	1-е измерение	38,8	39,3	38,9	38,8	39,1	38,9	38,9	38,7	38,9
	2-е измерение	38,7	39,2	38,9	38,8	38,9	38,8	38,8	38,6	38,8
Температура тела после введения препарата, °С	через 30 мин	38,8	39,6	38,8	39,0	38,8	38,9	38,8	38,7	38,6
	через 60 мин	38,9	39,7	38,9	39,2	38,7	39,0	38,9	38,8	38,7
	через 90 мин	38,8	39,1	38,8	39,2	38,7	38,9	38,9	38,8	38,6
Суммарное повышение температуры по итогам трех измерений $\sum \Delta t$, °С		0,4	1,0	0	1,0	0	0,4	0,2	0,5	0

Проверка комплексных препаратов на основе рекомбинантных белков *P. aeruginosa* с помощью ЛАЛ-теста показала, что содержание бактериальных эндотоксинов составляло в препарате 1-й серии – 35 ЕЭ/мл, в препарате 2-й серии – 11,3 ЕЭ/мл и в препарате 3-й серии – 21,1 ЕЭ/мл. Пороговая пирогенная доза согласно Фармакопее не должна превышать 5 ЕЭ/мл/кг, что позволяет применять препарат (в дозе 0,5 мл) у пациентов с массой тела от 3,5 кг. Таким образом, апиrogenность комплексного препарата на основе рекомбинантных белков *P. aeruginosa* доказана по двум параметрам: по концентрации эндотоксина и по действию *in vivo*.

3.3. Исследование иммунотоксичности

Имунотоксическое действие на гуморальное звено иммунитета оценивали по способности препарата вызывать неспецифическую поликлональную активацию лимфоцитов в тесте определения антителообразующих клеток методом локального гемолиза в геле по Эрне [128]. В этом опыте также исследовались три серии препарата, в каждой группе (1, 10, 50 и 250 прививочных доз) вычисляли среднее значение по трем сериям.

Результаты опыта по оценке способности препарата индуцировать поликлональную активацию лимфоцитов показаны в таблице 9.

Таблица 9. Оценка способности комплекса рекомбинантных белков *P. aeruginosa* вызывать неспецифическую активацию лимфоцитов селезенки мышей

Количество вводимого препарата, доз	Серия препарата	Количество антителообразующих на 1 мг массы селезенки ($M \pm \sigma$)	Индекс модуляции	Уровень достоверности
1	1	506,5±10,12	1,32	p> 0,05
	2	508,0±13,94	1,33	
	3	499,0±11,6	1,30	
10	1	579,5±18,5	1,51	p> 0,05
	2	583,5±17,3	1,52	
	3	575,0±13,2	1,50	
50	1	630,0±13,6	1,64	p> 0,05
	2	628,5±13,5	1,64	
	3	632,5±20,3	1,65	
250	1	532,5± 13,8	1,39	p> 0,05
	2	538,6± 13,6	1,41	
	3	538,5± 20,3	1,40	
Контрольная группа (только эритроциты барана)		383,0±47,9	-	-

Митогенное действие препарата было статистически не достоверным ($p > 0,05$). Число В-лимфоцитов селезенки мышей, продуцирующих антитела класса IgM к эритроцитам барана, максимально повышалось в 1,64 раза при введении 50-кратной дозы препарата.

Исследование влияния препарата на клеточное звено иммунитета проводили с помощью стимуляции реакции гиперчувствительности замедленного типа: при введении его в комплексе с эритроцитами барана – на мышах, и введении его в комплексе с полным адьювантом Фрейнда – на морских свинках.

В первом опыте мышей разделяли на две опытные и одну контрольную группы. В опытных группах выделяли три подгруппы по 10 особей каждая в соответствии серии препарата. Далее вычисляли средние значения по каждой группе. Результаты опыта отображены в таблице 10.

Индекс реакции гиперчувствительности замедленного в этом эксперименте не превышал значения в контроле (не более 2,23, по сравнению с 1,95 в контроле), что свидетельствовало о слабом раздражающем действии изучаемого комплекса.

Таблица 10. Оценка способности препарата вызывать реакцию гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана

Группа	Первое введение препаратов			Повторное введение препаратов (спустя 5 суток)		Индекс реакции			
	количество доз, вводимых внутривенно	серия	Введение препарата подкожно, доза	В подушечку левой задней лапы	В подушечку правой задней лапы				
1	1 доза	1	Эритроциты барана, 500 мкл, 2×10^8	Эритроциты барана, 50 мкл, 10^8	Физраствор, 50 мкл	2,21			
2		2				2,14			
3		3				2,18			
4	10 доз	1				Эритроциты барана, 500 мкл, 2×10^8	Эритроциты барана, 50 мкл, 10^8	Физраствор, 50 мкл	2,23
5		2							2,25
6		3							2,20
Контрольная	Физиологический раствор								1,95

Для индукции реакции ГЗТ на морских свинках использовали 6 опытных групп животных, которым вводили по 1 и 10 доз каждой серии комплекса соответственно. Полученные результаты представлены в таблице как средние значения баллов в группе из 6 морских свинок (табл.11). Препарат не вызывал выраженной реакции ГЗТ не превышала более 1,2 баллов, что указывало на отсутствие иммунотоксичности по отношению к клеточному иммунитету у морских свинок.

Таблица 11. Оценка индукции реакции ГЗТ с полным адьювантом Фрейнда у морских свинок

Сенсибилизация (1 день)		Внутрикожное введение через 21 день	Реакция через:		
Препарат	Доза		1 ч	24 ч	48 ч
1-й серии	однократная	10 доз в объеме 0,2 мл	0	1	0
	десятикратная		1	1,1	1
2-й серии	однократная		0	1	0
	десятикратная		1,1	1	1
3-й серии	однократная		1	1,2	1,1
	десятикратная		1,0	1,1	1,1
Физиологический раствор (контроль)	0		0	0	0

Таким образом, полученные данные указывают на отсутствие иммунотоксического действия препарата.

3.4. Исследование аллергизирующих свойств

Аллергизирующие свойства препарата исследовали в реакциях гиперчувствительности немедленного (реакция общей анафилаксии) и замедленного (по изменению массы конечности животного – тест отека лапки) типов [21].

Исследовали выраженность реакции гиперчувствительности немедленного типа при иммунизации морских свинок комплексным препаратом на основе рекомбинантных белков *P. aeruginosa*. Реакцию свинок на введение разрешающей дозы препарата неадсорбированных белков-компонентов определяли через 21 сутки после первой иммунизации, классифицируя реакцию с использованием буквенных индексов. У большинства морских свинок не наблюдали патологических реакций (Д). Четко выраженные частые почесывания, единичные

чихания, понижение температуры тела (Б) были выявлены у половины животных, которым вводили десятикратную прививочную дозу. Все эти симптомы проходили в течение часа (таблица 12). Индекс Вейгле не превышал 1, что соответствует слабой выраженности анафилактической реакции.

Таблица 12. Оценка анафилактической активности препарата на морских свинках

Группа	Сенсибилизация препаратами		Разрешающая доза	Количество особей со степенью выраженности реакции					ИВ		
				А	Б	В	Г	Д			
1 контрольная	Физ. р-р		Физ. р-р	0	0	0	0	10	0		
	Комплекс рекомбинантных белков	Серия		Доза							
2 контрольная		1		1	0	0	0	0	10	0	
3 контрольная		2			0	0	0	0	10	0	
4 контрольная		3			0	0	0	0	10	0	
1 опытная		1		1	Неадсорбированные белки	1	0	0	0	9	0,1
2 опытная		2				2	0	0	0	8	0,2
3 опытная	3		1	0		0	0	9	0,1		
4 опытная	1	10	0	5		0	0	5	1		
5 опытная	2		1	3		0	0	6	0,7		
6 опытная	3		2	3		0	0	5	0,8		

Примечание. ИВ – индекс анафилаксии по Вейгле

Гиперчувствительность замедленного типа исследовали на мышах, используя три серии препарата, по 10 мышей в группе. Исследование реакции замедленного типа по увеличению массы лапок мышей показало, что аллергический отек лапки не развивался (таблица 13).

Таблица 13. Оценка влияния препарата трех серий на развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей

Серия препарата	Масса контрольной лапки, г	Масса опытной лапки, г	Индекс реакции, %
1-я	0,13146±0,004	0,15632±0,008	18,9
2-я	0,13571±0,004	0,16475±0,009	21,4
3-я	0,13646±0,004	0,16276±0,006	19,3

Таким образом, при иммунизации комплексом рекомбинантных белков *P. aeruginosa* отмечалась слабовыраженная реакция гиперчувствительности немедленного типа при введении десятикратной дозы и отсутствие реакции гиперчувствительности замедленного типа. Следовательно, исследуемый препарат не обладал аллергизирующими свойствами.

Полученные данные опытов на животных подтвердили безопасность комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa*, выявили потенциал препарата для профилактики синегнойной инфекции у людей и целесообразность дальнейшего исследования событий, происходящих при формировании иммунного ответа на его введение.

Глава 4. ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ *P. AERUGINOSA* НА ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

Влияние вакцин на систему врожденного иммунитета – важный раздел вакцинологии. При вакцинации в первую очередь активируются механизмы системы врожденного иммунитета, заключающиеся в распознавании и поглощении попавших в организм чужеродных веществ и запуске воспалительного ответа. Наиболее важно на этом этапе поглощение иммуногенов фагоцитами с дальнейшим процессингом антигенов, их представлением Т-хелперам и выделением цитокинов и хемокинов, привлекающих в место введения клетки иммунной системы и влияющих на формирование реакций иммунного ответа [74]. Для эффективной индукции адаптивного иммунитета требуется активация механизмов врожденного, кроме того, вакцины способны оказывать долгосрочное влияние на систему врожденного иммунитета, воздействуя на резистентность организма к гетерологичным возбудителям [71, 187, 191, 215].

При исследовании этого этапа иммунного ответа изучено влияние препарата комплекса рекомбинантных белков *P. aeruginosa* на активацию фагоцитов (моноцитов и гранулоцитов крови при иммунизации), на созревание важнейших антиген-представляющих и иммунорегулирующих клеток – дендритных – и выделение ими цитокинов. Также представляло интерес исследовать секрецию цитокинов клетками селезенки, отражающую процессы, происходящие в ней при иммунизации, и содержание цитокинов в периферической крови иммунизированных животных.

4.1 Исследование влияния иммунизации комплексом рекомбинантных белков *P. aeruginosa* на фагоцитарную активность лейкоцитов мышей

С целью оценки влияния препарата на активность фагоцитов оценивали способность лейкоцитов крови мыши поглощать убитые клетки *Staphylococcus*

aureus in vitro. Мышей иммунизировали дважды с интервалом в 14 дней и исследовали фагоцитарную активность моноцитов и гранулоцитов через 7 и 14 дней после каждой иммунизации в сравнении с контролем (неиммунизированные мыши на сроке, соответствующем сроку 7 недель после первой иммунизации) (таблицы 14 и 15).

Таблица 14. Поглощение убитого нагреванием *Staphylococcus aureus* фагоцитами иммунизированных и неиммунизированных мышей

Группа животных		Моноциты		Гранулоциты	
№	Срок после иммунизации	% клеток, поглотивших стафилококк	Достоверность различия между группами	% клеток, поглотивших стафилококк	Достоверность различия между группами
1	Контроль	42,76±1,33 43(42,5-43)	P_{1и2}=0,0121 P_{1и3}=0,012 P_{1и4}=0,0119 P_{1и5}=0,0119	53,22±11,1 51(43-62)	P_{1и2}=0,0081 P_{1и3}=0,0122 P_{1и4}=0,0367 P_{1и5}=0,0122
2	7 сут после I иммунизации	77,82±5,29 77,59(75,59-82,31)	P_{2и1}=0,0121 P _{2и3} =0,676 P_{2и4}=0,021 P_{2и5}=0,012	77,68±4,32 79,9(72,2-80,7)	P_{2и1}=0,0081 P_{2и3}=0,0122 P _{2и4} =0,53 P _{2и5} =0,21
3	14 сут после I иммунизации	76,64±2,83 76,8(73,9-78,8)	P_{3и1}=0,012 P _{3и2} =0,676 P_{3и4}=0,0121 P_{3и5}=0,0121	90,64±4,14 91,8(88,4-92)	P_{3и1}=0,0122 P_{3и2}=0,008 P_{3и4}=0,037 P_{3и5}=0,0122
4	7 сут после II иммунизации	67,38±4,32 68,3(63,7-69)	P_{4и1}=0,0119 P_{4и2}=0,0215 P _{4и3} =0,1218 P _{4и5} =0,144	75,02±13,47 79,3(71,9-79,5)	P_{4и1}=0,0367 P _{4и2} =0,411 P_{4и3}=0,0367 P _{4и5} =0,403
5	14 сут после II иммунизации	63,08±2,38 62,8(61,9-64,5)	P_{5и1}=0,0119 P_{5и2}=0,0122 P_{5и3}=0,0121 P _{5и4} =0,143	73,58±3,65 73,4(70,2-75,5)	P_{5и1}=0,0122 P _{5и2} =0,121 P_{5и3}=0,012 P _{5и4} =0,403

Примечание: в первой строке – M±σ; во второй строке – Me – медиана значений; в скобках LQ-UQ – нижний и верхний квартили. Статистически достоверные значения отмечены жирным шрифтом (p<0,05, критерий Манна-Уитни).

Таблица 15. Индекс активации фагоцитарной активности фагоцитов (отношение опыт/контроль) у иммунизированных мышей

Срок наблюдения	Индекс активации фагоцитов	
	Моноциты, %	Гранулоциты, %
Первая иммунизация		
7 сут	1,82	1,46
14 сут	1,79	1,7
Вторая иммунизация		
7 сут	1,57	1,4
14 сут	1,47	1,38

Представленные данные свидетельствуют о том, что на 7-ые сутки после первой иммунизации отмечено усиление фагоцитоза бактериальных клеток гранулоцитами и, в большей степени, моноцитами (с 53,22% и 42,76% до 77,68% и 77,82%, в 1,46 и 1,82 раза соответственно). Высокий уровень активности фагоцитов сохранялся также на 14-ые сутки (моноциты – 76,64%), при этом активность гранулоцитов дополнительно увеличивалась (90,64%). Вторая иммунизация не повышала активность фагоцитов дополнительно, ее уровень значимо снижался по сравнению с первой иммунизацией до 63,08% и 73,58% к исходу 14 суток после второй иммунизации, однако, все же превышая значения контрольной группы. Следовательно, иммунизация препаратом активировала клеточное звено иммунной системы за счет гранулоцитов и макрофагов, которые являются профессиональными антигенпредставляющими клетками.

4.2 Исследование влияния иммунизации комплексом рекомбинантных белков *P. aeruginosa* на бактерицидную активность лейкоцитов мышей

Другим параметром, отражающим активацию фагоцитов, является их бактерицидная активность (процент погибших микробных клеток), которую оценивали на лейкоцитах периферической крови мышей. Проводили сравнение бактерицидной активности в отношении живой культуры *Staphylococcus aureus* через 4 и 24 часа после однократной иммунизации мышей комплексным препаратом, белками-компонентами, не адсорбированными на гидроксиде алюминия, либо только адъювантом гидроксидом алюминия, с группой контроля (неиммунизированные мыши) (таблицы 16 и 17).

Таблица 16. Бактерицидная активность лейкоцитов периферической крови мышей в отношении *Staphylococcus aureus*

Название препарата для исследования	% погибших клеток <i>S. aureus</i>			
	4 часа после иммунизации		24 часа после иммунизации	
	Время инкубации			
	1 ч	3 ч	1 ч	3 ч
Комплекс белков без Al(OH) ₃	39,26±1,59 x1,12	43,26±1,2 x1,11	41,0±2,17 x1,13	50,86±3,2* x1,34
Комплекс белков, адсорбированных на Al(OH) ₃	57,9±1,82* x1,64	65,36±2,4*)** x1,67	68,3±2,2*)** x1,89	79,54±6,1*)** x2,09
Гидроксид алюминия	31,9±1,96 x0,91	40,14±1,6 x1,02	31,46±3,45 x0,89	40,24±2,28 x1,06
Контроль (неиммунизированные)	35,2±1,7	39,12±2,1	36,22±1,44	38,04±1,12

Примечание. Данные представлены как $M \pm \sigma$. * – достоверность различий между опытом и контролем; ** – между препаратом-комплексом (с адъювантом) и неадсорбированными белками, $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни для независимых выборок.

Таблица 17. Бактерицидная активность лейкоцитов периферической крови мышей в отношении *Staphylococcus aureus*

Препарат для иммунизации	Индекс стимуляции бактерицидной активности			
	Время после иммунизации			
	4 ч		24 ч	
	время инкубации		время инкубации	
	1 ч	3 ч	1 ч	3 ч
Комплекс белков без Al(OH) ₃	1,12	1,11	1,13	1,34
Комплекс белков, адсорбированных на Al(OH) ₃	1,64	1,67	1,89	2,09
Гидроксид алюминия	0,91	1,02	0,89	1,06

Представленные данные свидетельствуют значимое усиление бактерицидной активности лейкоцитов мышей, иммунизированных комплексом рекомбинантных белков *P. aeruginosa*, уже через 4 часа после введения препарата (увеличение доли убитых микробных клеток с 57,9% до 65,36% при инкубации в течение 1 и 3 ч соответственно, по сравнению с контролем – 35,2% и 39,12% соответственно). Через 24 ч после иммунизации уровень бактерицидной активности лейкоцитов дополнительно увеличился, и доля убитых микробных клеток составила 68,3% и 79,54% при инкубации 1 и 3 ч соответственно). Белки-компоненты незначительно усиливали бактерицидную активность лейкоцитов, а адъювант гидроксид алюминия в отсутствие белков *P. aeruginosa* не влиял на бактерицидную активность лейкоцитов крови мышей.

4.3 Исследование влияния комплекса рекомбинантных белков

P. aeruginosa на созревание дендритных клеток мышей *in vitro*

Дендритные клетки являются важнейшими антиген-представляющими клетками. Они происходят из клеток-предшественников красного кроветворного костного мозга и в ходе дифференцировки первоначально превращаются в незрелые дендритные клетки, характеризующиеся высокой эндоцитарной активностью и низким потенциалом активации Т-клеток. Незрелые дендритные клетки с помощью паттерн-распознающих рецепторов захватывают из окружающей среды патогенные микроорганизмы и их антигены, после чего активируются, начиная созревать и мигрировать в лимфатические узлы, при этом представляя на своей поверхности фрагменты поглощенных антигенов в комплексе с главным комплексом гистосовместимости и усиливая экспрессию корцепторов активации Т-клеток, а также начинают секретировать разнообразные цитокины, управляющие иммунным ответом [74, 226].

Влияние препарата на созревание дендритных клеток, полученных из костного мозга мышей, и продукцию ими цитокинов исследовали путем оценки изменений их иммунофенотипа и концентрации цитокинов в питательной среде.

Эти показатели сравнивали на девятые сутки культивирования у дендритных клеток, созревавших в культуре:

- 1) под действием комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa*, адсорбированных на гидроксиде алюминия;
- 2) под действием комплекса этих белков, не адсорбированных на гидроксиде алюминия;
- 3) под действием классического индуктора созревания дендритных клеток – фактора некроза опухоли- α (ФНО α);
- 4) в отсутствие стимуляции (незрелые клетки).

Данные по изменениям иммунофенотипа дендритных клеток представлены в таблицах 17 и 18.

Таблица 17. Влияние комплекса рекомбинантных белков *P. aeruginosa* на созревание дендритных клеток у мышей.

Маркеры дендритных клеток	Процент клеток в популяции, позитивных по исследуемым маркерам, при стимуляции индуктором созревания			
	Белки OprF и анатоксин, без гидроксида алюминия	Комплекс рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i>	TNF- α	Без стимуляции (незрелые клетки)
CD34	18,53 \pm 1,3* 19,9(47,3-54,1)	15,46 \pm 2,4* 18(13,2-18)	17,36 \pm 1,35* 18,8(16,1-18,8)	42,9 \pm 1,9** 45(41,1-45)
CD14	44,27 \pm 3,72***)** 45,1(40,2-47,5)	42,1 \pm 2,87***)** 42,5(39-44,7)	37,6 \pm 3,19* 38,7(34-40,1)	58,2 \pm 3,32** 57(55,7-62)
CD38	30,4 \pm 3,05***)*** 30,5(27,3-33,4)	51,2 \pm 2,78* 51,7(48,2-53,7)	45,03 \pm 3* 45,1(42-48)	18,6 \pm 2,26** 19,2(16,1-20,5)
MHC I	70,16 \pm 3,1* 70,3(67-73,2)	73,43 \pm 3,4* 73,2(70,1-77)	69,8 \pm 2,42* 70,1(67,2-72)	45,2 \pm 2,82** 45,6(42,2-47,8)
MHC II	50,7 \pm 3,4***)*** 50,9(46,3-54,1)	73,1 \pm 3,3***)** 73,1(70,1-76,7)	52,3 \pm 3,1* 52,6(49,1-55,3)	22,36 \pm 2,35** 22,2(20,1-24,8)
CD80	51,56 \pm 2,2***)*** 51,5(49,4-53,8)	63,3 \pm 3,3* 63,2(60,1-66,7)	66,43 \pm 2,4* 66,39(64,1-68,9)	29,5 \pm 2,1** 29,8(27,3-31,5)
CD86	61,2 \pm 3,96* 61,6(57,1-65)	67,2 \pm 4* 67,6(63,1-71,1)	63,86 \pm 3,85* 63,7(60,1-67,8)	13,7 \pm 2,1** 13,4(11,7-16)
CD80/MHC II	50,2 \pm 2,7***)*** 50(47-53)	60,2 \pm 1,97* 60,5(48,1-53)	50,43 \pm 2,46* 50,2(48,1-53)	21,33 \pm 2,08** 20,5(19,8-23,7)
CD83	48,2 \pm 2,2* 48,3(45-51,4)	64,5 \pm 4,1***)** 64(60,4-68,6)	53,4 \pm 3,5* 53,1(50-57)	8,1 \pm 1,95** 8,1(6,1-10)
CD11c -/ CD123+	19,07 \pm 1,9***)*** 19(17,2-21)	32,8 \pm 2,6* 15,2(13,2-18)	36,9 \pm 1,6* 17,2(16,1-18,8)	12,5 \pm 2,13** 42,7(41,1-45)
CD11c+/ CD123-	25,3 \pm 2,2***)*** 35,3(23,1-27,5)	38,37 \pm 2,96* 38,6(35,3-41,2)	39,93 \pm 2,33* 40,4(37,4-42)	16,76 \pm 1,66** 17(15-18,3)
TLR2	31,2 \pm 2,56* 31,5(28,5-33,6)	36,1 \pm 2,85* 36,2(33,2-38,9)	35,7 \pm 4,9* 36,6(30,5-40,2)	54,86 \pm 3,8** 56,7(50,5-57,4)
TLR4	22,57 \pm 2,3* 22,7(20,2-24,8)	20,9 \pm 2,8* 21,8(17,8-23,2)	24,7 \pm 3,03 25,5(21,3-27,2)	28,9 \pm 1,71 29,1(27,1-30,5)

Примечание: в первой строке – $M \pm \sigma$; во второй строке: Me – медиана значений, в скобках LQ-UQ – нижний и верхний квартили. Статистически достоверные значения отмечены: знаком * – $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля; ** – $p < 0,05$ по сравнению с TNF- α ; *** – $p < 0,05$ по сравнению с адсорбированными белками (критерий Манна-Уитни).

Таблица 18. Индекс стимуляции созревания дендритных клеток мышей

Маркеры дендритных клеток	Индекс стимуляции (кратность увеличения популяции при созревании по отношению к незрелым клеткам)		
	Белки ОpgF и анатоксин, без гидроксида алюминия	Комплекс рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i>	TNF- α
CD34+	0,43	0,36	0,40
CD14+	0,76	0,72	0,66
CD38+	1,63	2,75	2,4
МНС I+	1,55	1,62	1,54
МНС II+	2,26	3,27	2,34
CD80+	1,74	2,14	2,25
CD86+	4,47	4,9	4,66
CD80/МНСII+	2,35	2,82	2,36
CD83+	5,95	7,96	6,59
CD11c-/CD123+	1,5	2,6	2,95
CD11c+/CD123-	1,5	2,3	2,38
TLR2+	0,57	0,66	0,64
TLR4+	0,78	0,72	0,85

Внесение в культуру незрелых дендритных клеток комплекса рекомбинантных белков *P. aeruginosa* индуцировало их созревание [62, 70, 74]: отмечалось увеличение доли клеток, экспрессирующих маркер терминальной дифференцировки CD83 – с 8,1% до 64,5%, маркер клеточной адгезии CD38 – с

18,6% до 50,2%, костимулирующие молекулы CD80 и CD86 – с 29,5% до 63,3% и с 13,7% до 67,2%. Происходило также усиление экспрессии главного комплекса гистосовместимости (МНС I и МНС II, с 45,2% до 73,43% и с 22,36% до 73,1% соответственно). Экспрессия рецепторов TLR2 и TLR4 снижалась (с 54,86% до 36,1% и с 28,9% до 20,9% соответственно). Содержание клеток, экспрессирующих рецептор липополисахарида CD14 (его экспрессия в большей степени характерна для моноцитов и макрофагов, хотя также он экспрессируется и некоторыми дендритными клетками) [107, 190, 237], при созревании снижалось.

Действие препаратов сорбированного и несорбированного комплекса рекомбинантных белков было сопоставимым с влиянием классического индуктора созревания дендритных клеток – TNF- α . Введение исследуемых препаратов в культуру незрелых дендритных клеток приводило к увеличению в популяции доли миелоидных дендритных клеток [62], экспрессирующих маркер CD11c (интегрин α -X) – с 16,76% до 38,37%. При этом белки с адьювантом действовали сильнее неадсорбированных белков.

Помимо миелоидных клеток, наблюдали формирование и плазмацитоидных дендритных клеток [62] с иммунофенотипом CD11c-/CD123+, экспрессирующих α -цепь рецептора IL-3. Как и в случае с миелоидными клетками, нарастание их числа в культуре (с 12,5% до 32,8%) при воздействии комплекса было значительным и соответствовало воздействию TNF- α , а неадсорбированный вариант имел более слабый эффект.

Также исследовали содержание клеток, экспрессирующих маркер CD34, наиболее характерный для незрелых (стволовых) гематопозитических клеток, в т.ч. предшественников дендритных клеток [38, 241].

В процессе созревания дендритных клеток с исследуемыми препаратами доля CD34+ клеток падала примерно настолько же, как и с TNF- α , при этом сочетание рекомбинантных белков с Al(OH)₃ было активнее неадсорбированных белков. Отмечено снижение доли CD34+ клеток с 42,9% до 15,46% при применении комплексного препарата адсорбированных рекомбинантных белков.

В результате проведенных исследований выявлено, что комплекс рекомбинантных белков OprF и анатоксина эффективно индуцируют созревание дендритных клеток из клеток-предшественников, увеличивая экспрессию большинства молекул, характеризующих зрелые дендритные клетки и участвующих в процессах презентации антигенов Т-лимфоцитам. Однако при этом экспрессия паттерн-распознающих рецепторов снижалась, что может свидетельствовать об изменении функции клеток от рецепции антигенов к их презентации лимфоцитам. Действие комплекса белков OprF и анатоксина является сопоставимым с действием TNF- α и в присутствии адьюванта – гидроксида алюминия – дополнительно усиливается.

4.4 Исследование влияния комплекса рекомбинантных белков

P. aeruginosa* на секрецию цитокинов дендритными клетками мышей *in vitro

При проведении эксперимента по индукции созревания дендритных клеток в культуре представляло интерес исследование секреции ими цитокинов, отражающей их функциональную активацию, для этого по окончании их культивирования отбирали пробы культуральной жидкости.

Сравнивали продукцию цитокинов дендритными клетками, созревающими *in vitro* при воздействии комплекса рекомбинантных белков *P. aeruginosa* и препарата белков-компонентов, не адсорбированных на гидроксида алюминия, в сравнении с TNF- α (положительный контроль) и отсутствием стимуляции (отрицательный контроль).

По окончании трех суток культивирования дендритных клеток с вышеуказанными препаратами измеряли содержание 23 цитокинов и хемокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, CCL11, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC (CXCL1), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), TNF- α) в пробах супернатантов клеточных культур с использованием набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad,

США) согласно инструкции производителя. Полученные данные представлены в таблицах 19 и 20.

Таблица 19. Влияние комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa* на секрецию цитокинов дендритными клетками *in vitro* у мышей

Цитокины	Концентрация цитокинов в супернатантах дендритных клеток, пг/мл			
	Белки OprF и анатоксин, без гидроксида алюминия	Комплекс рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i>	TNF- α	Без стимуляции (незрелые клетки)
IL-1 α	3362,25 \pm 220,25*)**	9888 \pm 1019*)**	266,75 \pm 1,25*	92 \pm 4)**
IL-1 β	1213,5 \pm 85,5*)**	4630,75 \pm 120,75*)**	42 \pm 5*	22 \pm 1)**
IL-6	6809,5 \pm 1098,5*)*	10929 \pm 968,75*)*	598,5 \pm 5,5*	57,75 \pm 57,75)**
TNF- α	1600 \pm 66,22*)**	5701 \pm 153,68*)**	183,13 \pm 4,1*	85,7 \pm 0,2)**
IL-4	42,22 \pm 0,69*)**	147,55 \pm 19,6*)**	19,26 \pm 1,09*	13,09 \pm 0,1)**
IL-10	716,9 \pm 77,95*)**	1293,255 \pm 25,47*)**	395,97 \pm 4,09*	235,87 \pm 11,72)*
IL-13	906 \pm 11,87*)**	1438,8 \pm 50,8*)**	557,23 \pm 0,2*	490,89 \pm 7,57)**
IL-12(p40)	10628 \pm 1561*)**	15320 \pm 2635*)**	3181 \pm 102,5*	933,5 \pm 14,5)**
IL-12(p70)	1936 \pm 124,7*)**	8435 \pm 819*)**	265,5 \pm 30,6*	183 \pm 0,2)**
IFN- γ	7946,7 \pm 1202,7*)*	8392,5 \pm 176,5*)**	458,7 \pm 17,25*	86 \pm 6)**
IL-17A	456,5 \pm 35,5*)**	785,5 \pm 210*)**	117,1 \pm 32,3*	82,7 \pm 4,1)**
KC(CXCL1)	7046,7 \pm 1202*)**	8392,5 \pm 176,5*)**	458,75 \pm 17,25*	86 \pm 6)**
MIP-1 α (CCL3)	4738 \pm 137,75*)**	1204,5 \pm 176*)**	2777,25 \pm 18,75*	552,75 \pm 66,25)*
MIP-1 β (CCL4)	5613,75 \pm 378,75*)**	8629,25 \pm 627,75*)**	3911,25 \pm 377,75*	745,75 \pm 16,75)*
RANTES (CCL5)	14121 \pm 1543*)**	19672 \pm 1332*)**	796 \pm 89*	164 \pm 10)**

Примечание: данные представлены как $M \pm \sigma$. Достоверность различий отмечена знаками: * - по сравнению с контролем (незрелые дендритные клетки, без стимуляции), ** - по сравнению с TNF α (классический индуктор созревания), $p < 0,01$ (по критерию Манна-Уитни).

Таблица 20. Индекс стимуляции секреции цитокинов дендритными клетками мышей *in vitro*

Цитокины	Индекс стимуляции (кратность увеличения концентрации цитокина в супернатанте при созревании по отношению к незрелым клеткам/клеткам, стимулированным TNF- α)		
	Белки ОpgF и анатоксин, без гидроксида алюминия	Комплекс рекомбинантных белков <i>P. aeruginosa</i>	TNF- α
IL-1 α	36,5/23,6	107/37	2,9
IL-1 β	55,16/28,9	210,5/110,2	1,9
IL-6	117,9/11,4	189,2/18,2	10,3
TNF- α	18,7/8,74	66,5/31,1	2,14
IL-4	3,3/2,19	11,27/7,6	1,47
IL-10	3/1,81	5,4/3,2	1,68
IL-13	1,84/1,62	2,93/2,58	1,13
IL-12(p40)	11,38/3,34	16,4/4,82	3,4
IL-12(p70)	10,57/7,29	46/31,7	1,45
IFN- γ	92,4/17,32	97,589/18,3	5,3
IL-17A	5,5/3,8	9,4/6,7	1,42
KC(CXCL1)	81,8/15,36	97,59/18,3	5,33
MIP-1 α (CCL3)	8,57/1,7	2,2/0,43	5
MIP-1 β (CCL4)	7,53/1,43	11,57/2,2	5,2
RANTES (CCL5)	86,1/17,7	119,9/24,7	4,85

Созревающие дендритные клетки секретировали большое количество цитокинов. Ряд цитокинов (IL-2, IL-3, IL-5, IL-9, CCL11, G-CSF, GM-CSF)

выявлены в культуральной жидкости не были. Концентрация остальных значительно повышалась (от нескольких раз до сотен раз) в ходе созревания дендритных клеток под воздействием классического индуктора TNF- α и исследуемых препаратов.

Исследуемые препараты (комплекс белков *P. aeruginosa*, адсорбированных на гидроксиде алюминия, и препарат неадсорбированных белков) увеличивали выработку цитокинов дендритными клетками сильнее, чем TNF- α .

Наиболее выраженной была стимуляция секреции провоспалительных цитокинов IL-1 [74, 77, 228]. Под действием комплекса OprF и анатоксина, адсорбированных на Al(OH)₃, концентрация IL-1 α возрастала с 92 до 9888 пг/мл, а IL-1 β – с 22 до 4630,75 пг/мл, в сотни раз (здесь и далее в тексте этого раздела указаны значения концентрации цитокинов при стимуляции комплексом OprF и анатоксина, адсорбированных на гидроксиде алюминия).

Секреция другого провоспалительного, острофазового цитокина TNF- α также повышалась значительно, особенно при воздействии адсорбированного комплекса – с 85,7 до 5701 пг/мл.

Иммунные ответы типа 2 критически зависят от канонических цитокинов, IL-4 и IL-13, двух родственных цитокинов, которые оба используют IL-4R α для передачи сигналов. [41, 51]

Секреция этих цитокинов многократно возрастала и была значительно выше при стимуляции исследуемыми препаратами, чем TNF- α , в свою очередь, действие комплексного препарата было мощнее действия неадсорбированных белков (IL-4 – с 13,09 до 147,55 пг/мл, IL-13 – с 490,89 до 1438 пг/мл).

Уровень другого Th2-цитокина, IL-10, возрастал с 235,87 до 1293,255 пг/мл. Цитокины IL-4, IL-10 и IL-13 являются важными цитокинами, вызывающими Th2-поляризацию Т-хелперов [74]. Под воздействием комплекса их уровень в культуральной среде повышался в несколько раз по сравнению с незрелыми клетками и был выше, чем при воздействии неадсорбированных белков, а эти оба показателя были больше, чем при созревании дендритных клеток под действием TNF- α .

IL-6 также является медиатором острой фазы воспаления, а также направляет поляризацию Т-хелперов по Th2-пути, а также в сочетании с другими цитокинами – по Th-17 пути [74, 80]. Его концентрация при созревании дендритных клеток под действием комплексного препарата изменялась схожим образом – возрастала с 57,75 до 10929 пг/мл.

IL-12 – важнейший фактор дифференцировки Т-хелперов по Th1-типу, состоящий из субъединиц α (p35) и β (p40), образующихся независимо друг от друга. При этом IL-12p40 (β -субъединица) способен секретироваться как самостоятельный цитокин, в количествах, значительно превышающих необходимые для образования целого IL-12. Предполагается, что это может иметь как регуляторное значение (конкуренция с IL-12 и уменьшение его действия, в т.ч. по механизму отрицательной обратной связи), так и вызывать различные провоспалительные и хемоаттрактивные эффекты в отношении различных типов иммунных клеток, в том числе и дендритных [27, 39, 64, 74]. Концентрация полного IL-12 выросла под действием комплексного препарата со 183 до 8435 пг/мл, а его β -субъединицы – с 933,5 до 15320 пг/мл.

Под действием комплексного препарата возрастала концентрация IFN- γ с 86 до 8392 пг/мл. Этот цитокин увеличивает экспрессию молекул МНС-I и МНС-II, а также активирует макрофаги и усиливает дифференцировку Т-хелперов по Th1-пути [74].

Комплекс рекомбинантных белков OprF и анатоксина усиливал секрецию с 82,7 до 785,5 пг/мл IL-17A, который имеет провоспалительное действие, усиливает продукцию различных других цитокинов, в том числе интерлейкинов, колониестимулирующих факторов, хемокинов. [124]

CXCL-хемокины служат важнейшими аттрактантами нейтрофилов, а CCL - различных типов клеток, в том числе гранулоцитов, моноцитов, лимфоцитов [74]. Их выработка под воздействием комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина и неадсорбированных белков возрастала в несколько раз, была выше, чем под действием TNF- α , однако в отношении CCL3 комплекс действовал слабее несорбированных белков и TNF- α . Концентрация CXCL1 возрастала с 86 до 8392

пг/мл, CCL3 – с 552,75 до 1204 пг/мл, CCL4 – с 745,75 до 8629,25 пг/мл, CCL5 – с 164 до 19672 пг/мл.

В результате проведенных исследований выявлено, что комплекс рекомбинантных белков *P. aeruginosa*, индуцируя созревание дендритных клеток, вызывал секрецию ими широкого ряда цитокинов, влияющих на дальнейшие этапы развития иммунного ответа, в том числе на поляризацию Т-хелперов, а сорбция на гидроксиде алюминия усиливала действие рекомбинантных белков *P. aeruginosa* в отношении секреции исследованных цитокинов. В ходе исследования наблюдалась секреция провоспалительных цитокинов, хемокинов, Th1- и Th2-цитокинов, при этом сильнее возрастала концентрация Th1-цитокинов.

4.5 Исследование цитокинового профиля периферической крови мышей при иммунизации комплексом рекомбинантных белков *P. aeruginosa*

Исследование продукции цитокинов *in vivo* проводили на мышах, иммунизированных внутривенно комплексом рекомбинантных белков OprF и анатоксина в стандартной дозе 0,5 мл.

У мышей получали сыворотку крови через 4, 8, 24 часа и через 14 суток после введения препарата. Результаты измерений уровней цитокинов представлены в таблице 21.

Таблица 21. Изменения концентрации цитокинов (пг/мл) в сыворотке крови иммунизированных мышей на разных сроках наблюдения

Цитокин	Срок наблюдения				
	0 ч	4 ч	8 ч	24 ч	14 суток
IL-1 α	8,4 \pm 2,1	43,2 \pm 5,27*	21,37 \pm 3,2*	6,7 \pm 0,95	7,87 \pm 0,47
IL-1 β	2,43 \pm 0,56	18,47 \pm 1,96*	32,47 \pm 2,5*1	10,4 \pm 1,21*	4,82 \pm 0,45
IL-2	2,8 \pm 0,45	5,5 \pm 0,81*	7,53 \pm 1,09*	5,4 \pm 0,85*	3,3 \pm 0,33
TNF- α	4,53 \pm 0,95	11,67 \pm 2*	22,46 \pm 2,5*	38,5 \pm 3,95*	7,5 \pm 0,67*
IFN- γ	1,4 \pm 0,1	1,56 \pm 0,2	1,46 \pm 0,3	15,23 \pm 2,05*	5,9 \pm 0,32
IL-12p70	6,41 \pm 0,81	7,7 \pm 0,45	23,13 \pm 3*	34,23 \pm 3,1*	9,8 \pm 1,1
IL-4	4,99 \pm 0,16	4,23 \pm 0,51	7,06 \pm 0,4*	3,6 \pm 0,4	5,2 \pm 0,28
IL-5	4,26 \pm 1,2	12,27 \pm 2,35*	4,06 \pm 0,56	5,93 \pm 0,8	3,1 \pm 0,27
IL-6	3,42 \pm 0,6	5,53 \pm 0,81	7,46 \pm 1,75*	18,43 \pm 2,04*	3,89 \pm 0,38
IL-10	5,7 \pm 0,91	6,96 \pm 0,8	7,63 \pm 1,1	21,13 \pm 2,6*	6,34 \pm 0,56
IL-13	3,66 \pm 0,66	5,35 \pm 0,69	4,39 \pm 0,73	5,52 \pm 0,76	3,78 \pm 0,55
IL-17A	19,33 \pm 3,04	2489 \pm 78,5*	4801 \pm 72,27*	146,3 \pm 12,58*	24,5 \pm 2,65
IL-21	0	3,66 \pm 0,96*	17,13 \pm 1,59*	11,77 \pm 2,33*	2,5 \pm 0,24
IL-22	4,63 \pm 1,4	6,46 \pm 0,96	15,03 \pm 2,43*	4,4 \pm 1,03	4,5 \pm 0,35

Примечание: данные представлены как $M \pm \sigma$. * – достоверность различий по сравнению с контролем, $p < 0,05$ (по критерию Манна-Уитни).

Уровень провоспалительного цитокина острой фазы IL-1 α значимо повышался на сроке наблюдения 4 ч (с 8,4 до 43,2 пг/мл), далее снижался, оставаясь высоким (21,37 пг/мл) через 8 часов после введения ($p < 0,05$) и после 24 часов значимо не отличался (6,7 пг/мл) от значений контрольной группы. Повышение уровня IL-1 β (со значения 2,43 пг/мл) достигало максимума (32,47 пг/мл) через 8 часов после введения, затем снижаясь, оставаясь значимо выше значений в контроле на протяжении первых суток наблюдения. Уровень фактора некроза опухоли α повышался постепенно (со значения 4,53 пг/мл), достигал

максимума к 24 часам (38,5 пг/мл), и оставался значимо выше контроля (7,5 пг/мл) на сроке до 14 суток после иммунизации.

IFN- γ повышался так же постепенно (со значения 1,4 пг/мл), достигая максимума на том же сроке (15,23 пг/мл).

Уровень IL-2, вызывающего пролиферацию и дифференцировку Th1-клеток, повышался постепенно до максимума на 8 ч наблюдения (с 2,8 до 7,53 пг/мл), а затем снижался. Концентрация IL-12, являющегося важнейшим индуктором дифференцировки по Th1-типу, значимо возросла к 8 часам наблюдения и достигла максимума к 24 часам (от 6,41 до 23,13 и 34,23 пг/мл, соответственно).

Цитокины IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13 относят к группе Th2-цитокинов [74]. Уровни IL-4 и IL-5 умеренно повышались в течение 8 часов (с 4,99 до 7,06 пг/мл) и 4 часов (с 4,26 до 12,27 пг/мл) соответственно, уровни IL-6 и IL-10 повышались более значительно с максимумом через 24 часа после иммунизации (с 3,42 до 7,46 пг/мл и с 5,7 до 21,13 пг/мл, соответственно). Значимых изменений концентрации IL-13 выявлено не было.

IL-17 и IL-22 считаются важными цитокинами в борьбе иммунной системы с *P. aeruginosa*, вызывают рекрутирование и активацию фагоцитов. IL-21 обладает плеiotропными эффектами, включающими индукцию дифференцировки по Th17-пути, активацию макрофагов и NK-клеток [148].

Отмечалось значительное (в сотни раз, с 19,33 до 4801 пг/мл) повышение уровня IL-17, а также умеренное повышение IL-21 (с 0 до 17,13 пг/мл) и IL-22 (с 4,63 до 15,03 пг/мл) с максимумом на сроке 8 часов после иммунизации.

Таким образом, в первые сутки после введения комплексного препарата на основе рекомбинантных белков *P. aeruginosa* в сыворотке крови мышей повышались уровни провоспалительных цитокинов, Th1, Th2 и Th17 цитокинов, что свидетельствовало об активации различных механизмов иммунного ответа. Наиболее выраженным было повышение уровня IL-17.

4.6 Спонтанная и индуцированная фитогемагглютинином секреция цитокинов лимфоцитами селезенки мышей при иммунизации комплексом рекомбинантных белков *P. aeruginosa*

Проведено сравнительное исследование образования цитокинов лимфоцитами селезенки мышей через 14 суток после иммунизации комплексом рекомбинантных белков *P. aeruginosa* при стимуляции фитогемагглютинином в сравнении с неиммунизированными мышами с использованием той же тест-системы FlowCytomix Th1/Th2 Mouse 10 plex. Данные представлены в таблице 22.

Выявлено, что у иммунизированных мышей клетки активнее синтезировали цитокины IFN- γ и IL-12p70, определяющие Th1-поляризацию Т-хелперов. При этом у иммунизированных мышей секреция провоспалительных цитокинов IL-1 α и IL-1 β снижалась. Изменения секреции цитокинов, определяющие Th2-поляризацию, были разнонаправленными: уровни IL-5 и IL-10 у иммунизированных мышей оказались выше, а IL-13 – ниже, чем у неиммунизированных. Также у иммунизированных животных отмечено увеличение секреции IL-22, являющегося одним из важных факторов, обеспечивающих иммунитет к *P. aeruginosa*.

Таблица 22. Секретция цитокинов лимфоцитами селезенки мышей *in vitro* при стимуляции фитогемагглютинином

Цитокин	Контроль	Контроль/ФГА	Иммунизированные	Иммунизированные/ФГА
IL-1 α	5,3 \pm 0,75	58,65 \pm 1,94	4,23 \pm 0,51	10,6 \pm 2,19*
IL-1 β	5,7 \pm 0,36	39,37 \pm 2,96	5,1 \pm 0,91	21,2 \pm 2,1*
IL-2	9,3 \pm 1,41	17,33 \pm 2,05	5,6 \pm 0,91	21,37 \pm 2,87
TNF- α	3,3 \pm 0,65	11,8 \pm 7,43	3,23 \pm 0,8	16,2 \pm 2,1
IFN- γ	31,97 \pm 3,32	107,9 \pm 13,47	48,57 \pm 6,23	164,7 \pm 7,37*
IL-12p70	6,76 \pm 0,45	18,2 \pm 2	18,27 \pm 2,1	45,17 \pm 5*
IL-4	6,43 \pm 0,22	24,07 \pm 2,9	4,26 \pm 1,05	25,3 \pm 2,74
IL-5	3,36 \pm 0,8	12,87 \pm 2,27	4,4 \pm 0,01	43,43 \pm 58,78*
IL-6	4,66 \pm 0,85	21,37 \pm 2,75	3,76 \pm 0,35	15,4 \pm 2,95
IL-10	12,43 \pm 2,27	45,77 \pm 3,65	28,33 \pm 2,96	67,73 \pm 5,98*
IL-13	8,51 \pm 1	514,9 \pm 53,03	9,2 \pm 1,01	112,41 \pm 14,01*
IL-17A	154 \pm 7,93	2444 \pm 82,98	38,19 \pm 3,93	2450 \pm 71,51
IL-21	0	34,6 \pm 4,38	17,67 \pm 17,3	39,07 \pm 3,1
IL-22	11,63 \pm 1,59	27,87 \pm 2,8	25,9 \pm 2,55	45,83 \pm 3,75*

Примечание: данные представлены как $M \pm \sigma$. * - достоверность различий по сравнению со стимулированными спленоцитами неиммунизированных мышей, $p < 0,05$ (по критерию Манна-Уитни).

Таким образом, в ходе исследований выявлено, что комплекс рекомбинантных белков *P. aeruginosa* эффективно стимулировал созревание дендритных клеток *in vitro* и секретцию ими цитокинов, усиливал их синтез *in vivo*, активировал фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов, индуцировал секретцию провоспалительных, Th1/Th2/Th17 цитокинов *in vivo*, изменял секретцию цитокинов спленоцитами иммунизированных животных.

Глава 5. ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ *P. AERUGINOSA* НА АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ

Механизм действия вакцин основан на индукции адаптивного иммунитета, выражающегося в проявлении протективного эффекта в ответ на введение специфических протективных антигенов возбудителей инфекций. При формировании иммунной защиты в организме могут происходить различные события со стороны клеточных и гуморальных звеньев. В настоящем исследовании изучены изменения иммунофенотипа лимфоцитов селезенки мышей, отражающие активацию различных функциональных типов в ответ на иммунизацию; оценены особенности антительного ответа, определяющие его эффективность: напряженность (уровни титров специфических антител к антигенам вакцины), продолжительность и изотипический состав специфических антител, служащий показателем их эффективности и отражающий процессы поляризации Т-хелперов.

5.1. Исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки

Сравнительное исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки мышей при иммунизации комплексом рекомбинантных белков *P. aeruginosa* показало, что в опытной группе (иммунизированные мыши) изменялась некоторых типов клеток по сравнению с контролем (табл. 23). Увеличилась доля клеток, несущих маркеры CD16/CD32 (рецепторы к Fc-фрагменту IgG, FcγRII и FcγRIII) – в 1,64 раз, с 8,06 до 13,28%. Среди лимфоцитов такой иммунофенотип характерен для NK-клеток [66]. Повысилось число CD4+Т-хелперов (в 1,25 раза, с 36,04 до 45,17%) и CD19+ В-лимфоцитов (в 2,3 раз, с 12,17 до 28,17%). Доля клеток, позитивных по маркеру CD5 (имеющему регуляторные функции, служащему коstimуляционной молекулой для Т-лимфоцитов и увеличивающему выживаемость лимфоцитов) [244] выросла в 1,13 раза (с 45,3 до 51,5%). Наблюдалось снижение численности цитотоксических

лимфоцитов (CD8⁺, в 1,47 раз, с 21,63 до 14,7%) по сравнению с контролем (неиммунизированные мыши). В общей популяции клеток повышалось содержание типов, экспрессирующих маркеры ранней [30] (CD25⁺; с 5,33 до 29,4%) и поздней [30, 74] (МНСII⁺; с 14,3 до 25,43%) активации клеток.

Таблица 23. Иммунофенотип лимфоцитов селезенок мышей, иммунизированных комплексом рекомбинантных белков *P. aeruginosa*

Маркеры	Позитивные по исследуемому маркеру клетки (%)		
	Опыт	Контроль	Кратность увеличения
CD3 ⁺	58,57±0,7	61,37±1,09	0,95
CD16 ⁺ /CD32 ⁺	13,28±1,81*	8,06±0,68	1,65
CD3 ⁺ /CD16/CD32	5,46±0,40	3,06±0,25	1,78
CD3/CD4 ⁺	45,17±1,05*	36,04±0,88	1,27
CD4/CD25 ⁺	29,4±1,93*	5,33±0,85	5,52
CD5 ⁺	51,5±0,8*	45,3±0,96	1,14
CD19 ⁺	28,17±1,33*	12,17±1	2,31
CD3 ⁺ /CD8a ⁺	14,7±1,03*	21,63±1,66	0,68
МНСII ⁺	25,43±1,06*	14,3±0,91	1,78

Примечание: данные представлены как М±σ. * – достоверность различий по сравнению с контролем, p<0,05 (по критерию Манна-Уитни).

5.2. Исследование изотипического спектра секретируемых антител

Изотипический спектр антител, вырабатываемых в ответ на иммунизацию комплексным препаратом, исследовали методом иммуноферментного анализа.

Основными классами (изотипами) антител крови являются IgM, вырабатываемые в первую очередь, и IgG, характерные для более поздних стадий иммунного ответа. В свою очередь, класс IgG делится на ряд субклассов (субизотипов), не идентичных у человека и различных видов животных, так, у мыши он представлен IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3, отличающихся своими свойствами [74]. Используя конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела, реагирующие с определенными субклассами иммуноглобулинов мыши, определяли титры различных субклассов антител к антигенам-компонентам препарата в сыворотках мышей, иммунизированных двукратно с интервалом в 2 недели. Через 3 недели после курса иммунизации исследовали по 10 сывороток иммунизированных мышей, в качестве контроля использовали сыворотки интактных мышей. Определяли титры антител изотипов IgM и IgG, а также субизотипов IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3.

Титры исследованных антител у контрольных (неиммунизированных) животных не определялись в разведениях свыше 1:100. У иммунизированных животных наблюдалось статистически достоверное нарастание ($p < 0,01$) в крови титров антител к белкам-компонентам препарата классов IgM и IgG, а также субизотипов IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 к OprF и анатоксину по сравнению с контролем (интактные мыши).

Данные представлены в таблицах 24 и 25 и на рисунках 1 и 2.

Таблица 24. Уровни антител к белку OprF у иммунизированных мышей, определенные методом ИФА

Сыворотка (номер образца)	Титры антител к OprF в ИФА (1:х)					
	IgM	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
1	1600	12800	12800	1600	6400	6400
2	200	51200	12800	12800	25600	800
3	800	12800	6400	800	3200	400
4	1600	51200	6400	25600	25600	12800
5	800	25600	6400	12800	12800	1600
6	800	25600	6400	6400	6400	3200
7	400	25600	12800	6400	3200	200
8	1600	25600	6400	800	1600	100
9	3200	102400	51200	25600	25600	1600
10	3200	3200	800	12800	3200	200
Среднее значение	1420	33600	12240	10560	11360	2730

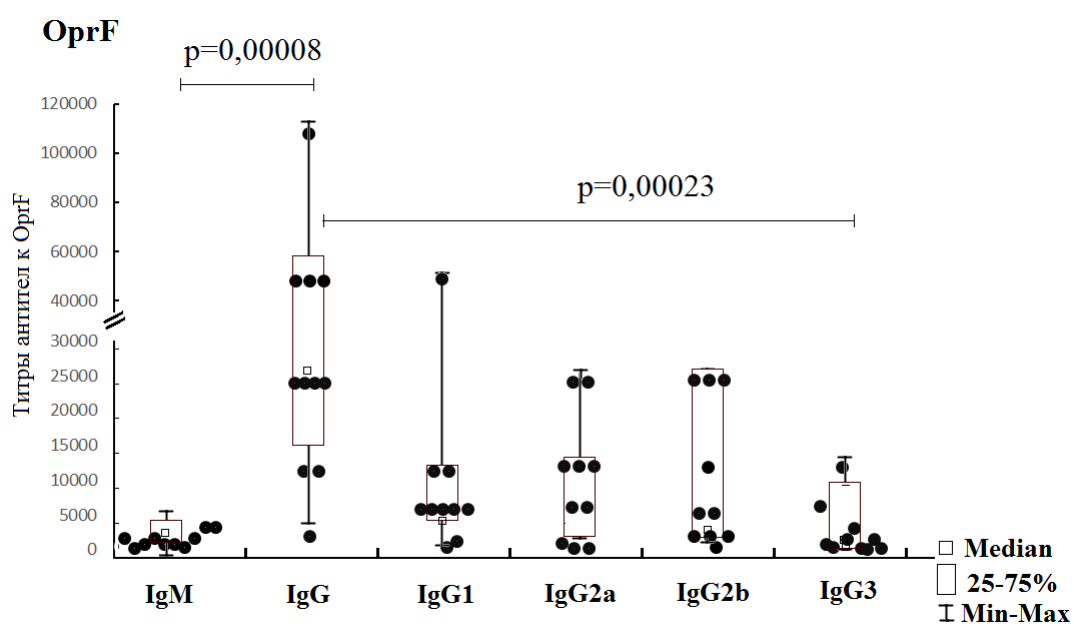


Рисунок 1. Спектр антител к белку OprF у иммунизированных мышей

Таблица 25. Уровни антител к рекомбинантному анатоксину у иммунизированных мышей, определенные методом ИФА

Сыворотка (номер образца)	Титры антител к анатоксину в ИФА (1:x)					
	IgM	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
1	1600	12800	25600	12800	3200	3200
2	400	51200	25600	12800	25600	1600
3	1600	51200	51200	6400	12800	100
4	1600	102400	25600	51200	102400	6400
5	800	51200	12800	1600	6400	100
6	800	51200	12800	1600	6400	1600
7	800	51200	25600	12800	6400	0
8	3200	102400	102400	1600	6400	100
9	800	102400	51200	51200	25600	200
10	3200	6400	800	1600	1600	1600
Среднее значение	1480	58240	33360	15360	19680	1490

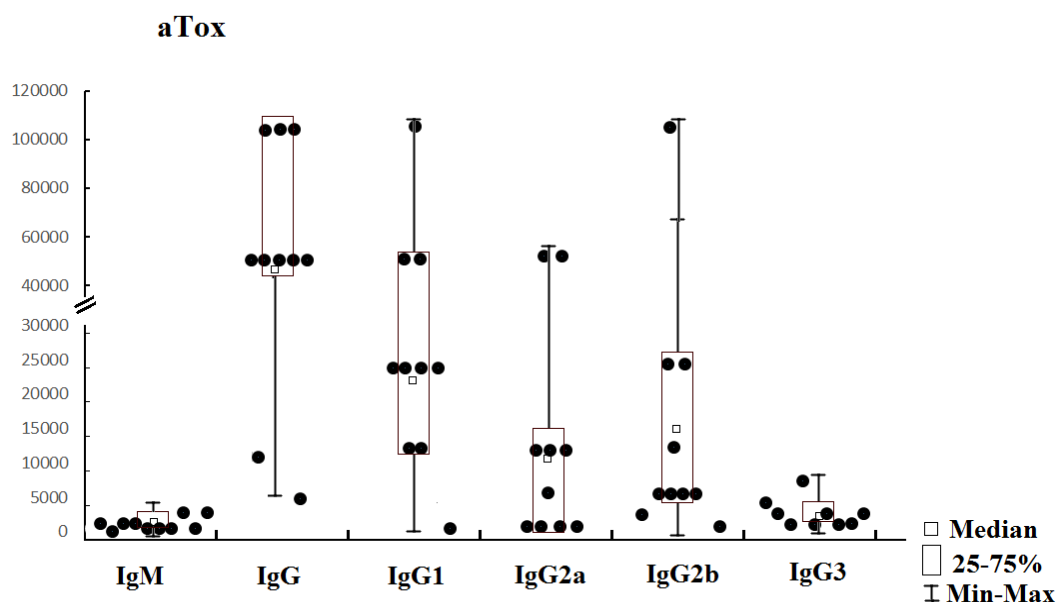


Рисунок 2. Спектр антител к рекомбинантному анатоксину у иммунизированных мышей

В результате исследования выявлено достоверное нарастание титра антител всех исследованных классов и субклассов на сроке 3 недели после двукратной иммунизации. На этом сроке концентрация антител класса IgM, формирующихся в первую очередь при иммунном ответе на антигены, уже снижалась, оставаясь значимо выше, чем в контрольной группе, и преобладали антитела класса IgG.

Таким образом, образовывались специфические антитела, служащие маркерами обоих путей дифференцировки Т-хелперов, наиболее выраженным было образование IgG1-иммуноглобулинов.

5.3. Исследование продолжительности иммунного ответа

Вакцины должны вызывать длительный напряженный иммунный ответ, чтобы быть эффективными. Поэтому с целью оценки стойкости иммунитета проведено исследование по измерению титров антител после иммунизации как его маркера.

Уровень специфических антител классов IgM и IgG, реагирующих с белками-компонентами препарата, OpgF и рекомбинантным анатоксином (aTox), в сыворотке крови иммунизированных мышей исследовали в различные интервалы времени после двукратной внутрибрюшинной иммунизации комплексом рекомбинантных белков *P. aeruginosa*.

Продолжительность иммунитета определяли по содержанию суммарных антител к белкам-компонентам препарата в сыворотках иммунизированных мышей. Для этого тотальный забор крови у 10 иммунизированных животных с получением сывороток производили через 2, 4, 8 и 12 недель после 2-й иммунизации, сыворотки исследовали в разведениях от 1:1000 до 1:128000. Для сравнения исследовали сыворотки 10 неиммунизированных (контрольных) животных: в разведении 1:1000 антитела в них не определялись.

У иммунизированных животных было выявлено появление антител к белкам-компонентам комплекса в титрах до 1:32000. В течение срока наблюдения их уровень постепенно снижался, но оставался значимо выше, чем в контрольной

группе. На всех сроках наблюдения титр антител иммунизированных животных был статистически значимо выше, чем в контроле ($p < 0,01$, критерий Манна-Уитни). Титры антител к белкам-компонентам показан в таблицах 26 и 27 и рисунках 3-4.

Таблица 26. Уровни антител к рекомбинантному белку OprF у иммунизированных мышей по срокам наблюдения

Номер образца	Титры антител к рекомбинантному OprF по срокам наблюдения, 1:х			
	2 недели	4 недели	8 недель	12 недель (срок наблюдения)
1	16000	16000	4000	2000
2	4000	8000	2000	2000
3	8000	8000	x	2000
4	8000	8000	4000	2000
5	8000	16000	4000	1000
6	16000	4000	1000	2000
7	4000	8000	8000	2000
8	32000	16000	x	2000
9	16000	8000	8000	4000
10	32000	32000	4000	x
Среднее значение	14400	12400	4375	2111,1

Примечание. Значком x отмечены исключенные недостоверные результаты

Таблица 27. Уровни антител к рекомбинантному анатоксину у иммунизированных мышей по срокам наблюдения

Номер образца	Титры антител к рекомбинантному анатоксину по срокам наблюдения, 1:			
	2 недели	4 недели	8 недель	12 недель (срок наблюдения)
1	16000	16000	8000	2000
2	8000	16000	4000	4000
3	32000	16000	16000	4000
4	2000	16000	4000	1000
5	4000	16000	8000	1000
6	16000	1000	1000	4000
7	16000	16000	8000	4000
8	32000	8000	2000	2000
9	32000	8000	4000	4000
10	32000	16000	4000	8000
Среднее значение	19000	12900	5900	3400

Таким образом, в течение срока наблюдения (12 недель) у иммунизированных мышей сохранялся напряженный иммунитет к белкам-компонентам комплексного препарата.

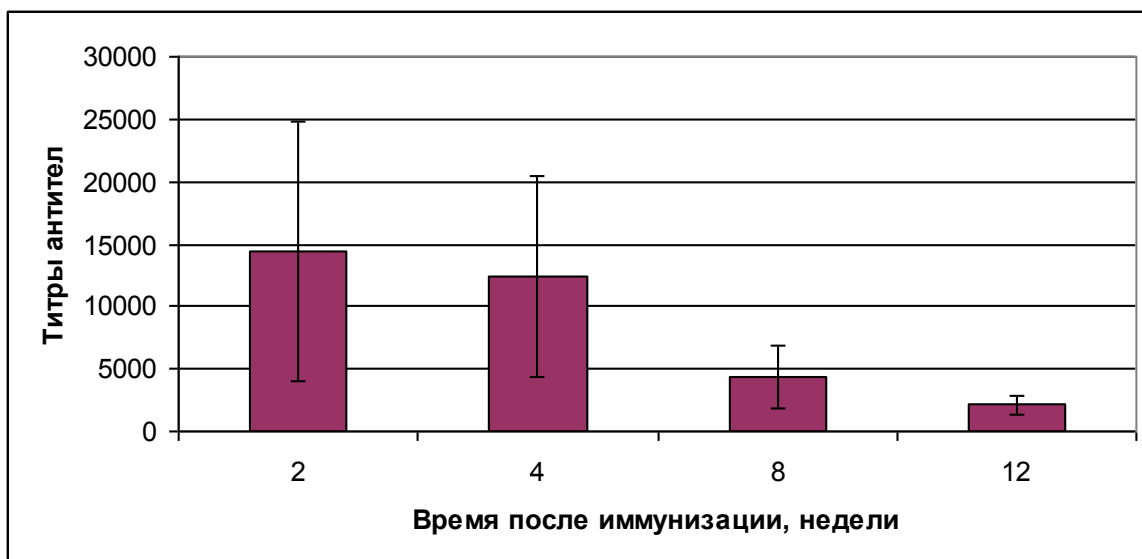


Рисунок 3. Уровни антител к рекомбинантному белку OprF у иммунизированных мышей по срокам наблюдения. Данные представлены как $M \pm \sigma$

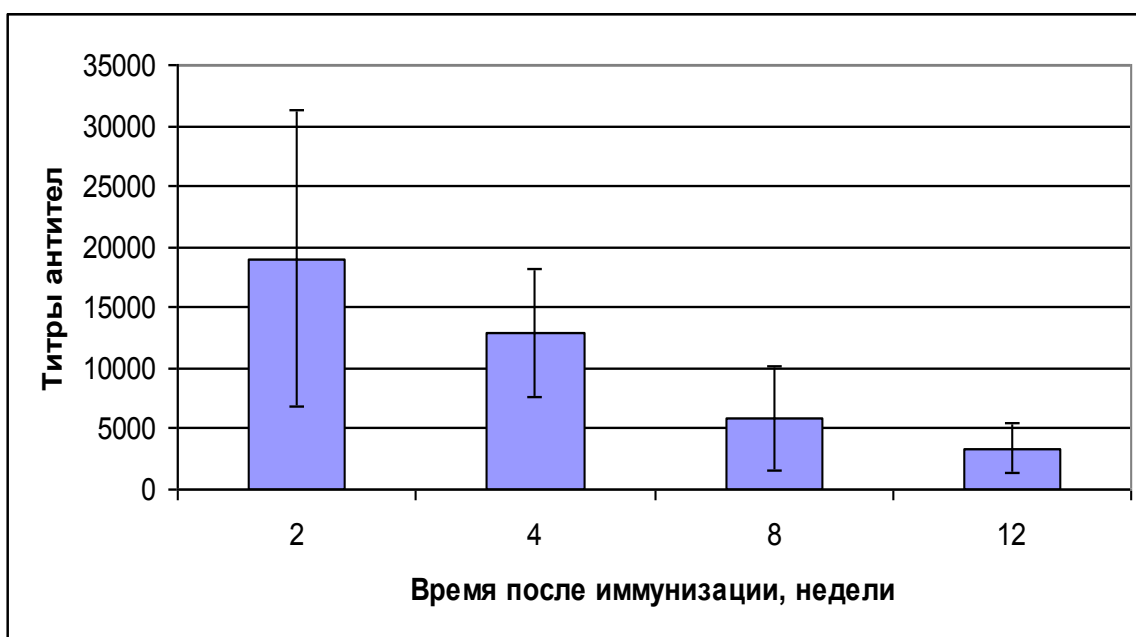


Рисунок 4. Уровни антител к рекомбинантному анатоксину у иммунизированных мышей по срокам наблюдения. Данные представлены как $M \pm \sigma$

В результате исследований установлено, что комплекс рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa* изменяет иммунофенотип лимфоцитов селезенки в сторону преобладания гуморального иммунитета, эффективно стимулирует образование антител к входящим в его состав рекомбинантным белкам *P. aeruginosa*, напряженный иммунитет сохраняется до 12 недель после иммунизации (срок наблюдения).

Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ *P. AERUGINOSA*

Для определения протективного эффекта комплекса проводили эксперименты с внутрибрюшинным заражением мышей, иммунизированных тремя сериями препарата, через две недели после введения. Результаты экспериментов, расчеты 50% летальной дозы возбудителя и индекса эффективности иммунизации представлены в таблице 14.

Таблица 14. Протективные свойства комплекса рекомбинантных белков на модели внутрибрюшинного заражения мышей

Группа животных	Доза заражения, млн клеток <i>P. aeruginosa</i>	Количество павших животных/количество животных в группе	LD ₅₀ , млн клеток <i>P. aeruginosa</i>	ИЭ
Контрольная	100	50/50	34,86	-
	50	32/50		
	25	15/50		
	12,5	3/50		
	6,25	1/50		
Иммунизированные 1-й серией препарата	200	37/50	97,26	2,79
	100	23/50		
	50	11/50		
	25	5/50		
	12,5	1/50		
Иммунизированные 2-й серией препарата	200	33/50	116,47	3,34
	100	20/50		
	50	9/50		
	25	2/50		
	12,5	0/50		
Иммунизированные 3-й серией препарата	200	34/50	118,1	3,39
	100	16/50		
	50	11/50		
	25	2/50		
	12,5	0/50		

Установлено, что двукратная иммунизация комплексом препаратом рекомбинантных белков *P. aeruginosa* повышает выживаемость мышей при внутрибрюшинном заражении их живой вирулентной культурой этой бактерии. Индекс эффективности (отношение LD₅₀ для иммунизированных мышей к LD₅₀ в контрольной группе) соответствовал значению 2,79 для 1-й серии препарата, 3,34 для 2-й и 3,39 для 3-й.

Доказанный протективный эффект препарата говорит о его потенциале применения у людей.

Глава 7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи современной медицинской науки позволили решить ряд проблем профилактики и лечения инфекционных болезней, но на смену им пришли новые. Эволюция микроорганизмов, бороться с которой человечество еще не научилось, привела к распространению новых патогенов и адаптации уже известных к изменяющимся условиям существования. Камнем преткновения остаются бактерии-возбудители внутрибольничных инфекций, накапливающие механизмы резистентности к антибиотикам, вплоть до появления «супербактерий», резистентных ко многим классам антибактериальных препаратов. Среди таких проблемных бактерий стоит особняком синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa*, которая не только вызывает нозокомиальные и раневые инфекции, поражает больных с различными хроническими заболеваниями и иммунодефицитными состояниями, но и является одной из важнейших причин прогрессирования поражения легких при муковисцидозе.

Вопрос, возможно ли создание вакцин, способных обеспечить протективный иммунитет против *P. aeruginosa*, особенно у людей с ослабленным иммунитетом, остается открытым. Только клинические испытания могут подтвердить эффективность лекарственных препаратов, в том числе и вакцин. Однако этому должен предшествовать серьезный этап доклинических исследований, включающий изучение механизмов и особенностей действия препарата, оценки его эффективности и безопасности на лабораторных животных.

Разработки вакцин для профилактики инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, систематически ведутся с 60-х годов XX века. Вероятно, поводом для этих исследований явилась малая чувствительность и растущая резистентность этой бактерии к антибактериальным препаратам, наиболее плодотворная пора поисков которых пришлась как раз на 40-е – 60-е годы. Исследователи шли от старых методов создания вакцин, таких как инаktivация цельных бактериальных клеток, к все более технологичным – например, к созданию препаратов-экстрактов и получению химически чистых антигенов, прежде всего, O-антигена. На этом пути

они столкнулись с рядом проблем, в частности, связанных с реактогенностью, вызванной липополисахаридом, и сложностями создания эффективных мультивалентных вакцин, защищающих от множества серотипов синегнойной палочки. В течение этих лет накапливались знания об антигенной структуре и факторах вирулентности *P. aeruginosa* и особенностях иммунного ответа на нее. В то же время были разработаны новые методы молекулярной биологии, в частности, генная инженерия, получившая широкое применение в вакцинологии. С 80-х годов в мире разрабатываются кандидатные вакцины на основе рекомбинантных белков синегнойной палочки. Технология рекомбинантных белков позволяет получать в большом количестве высокоочищенные целевые антигены и модифицировать их, в том числе для повышения их иммуногенности или лишения токсических свойств. Исследования рекомбинантных белков *P. aeruginosa* в качестве вакцинных антигенов велись в лаборатории протективных антигенов НИИВС им. И.И. Мечникова с 2000-х годов [8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 26]. В качестве прототипа кандидатной вакцины был предложен комплекс рекомбинантных OprF и анатоксина, адсорбированных на геле гидроокиси алюминия, исследованию свойств которого посвящена данная работа: с одной стороны, свойств, определяющих безопасность его как иммунобиологического препарата [21], с другой – особенностей воздействия на эффекторы иммунной системы и формирование протективных свойств.

На первом этапе работы были исследованы свойства комплекса рекомбинантных белков, определяющие его безопасность для животных и открывающие перспективность дальнейшего изучения механизмов формирования иммунной защиты при вакцинации.

При оценке безопасности изучали острую токсичность препарата в опытах на мышах и морских свинках, ориентируясь на появление клинических признаков и прирост массы тела. На протяжении периода исследования не выявлено гибели, каких-либо болезненных проявлений, изменений кожных покровов и поведенческих реакций у животных после применения доз, многократно превышающих нормальную. Не зафиксировано значимых различий в

потреблении корма и приросте массы тела у опытных и контрольных животных. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии острой токсичности комплексного препарата на основе рекомбинантных белков *P. aeruginosa*.

При изучении пирогенных свойств оценивали содержание эндотоксина при помощи ЛАЛ-теста и в опыте по внутривенному введению кроликам, в обоих опытах была показана апиrogenность препарата.

Далее исследовали иммунотоксические свойства комплекса, отражающие его модифицирующее влияние на иммуногенез (возможную иммуносупрессию либо гиперстимуляцию иммунитета), способные ослабить неспецифическую резистентность организма, повлиять на развитие аутоиммунных и аллергических реакций [4, 10, 20]. В ходе проведенных исследований выявлено, что препарат не индуцировал неспецифическую поликлональную пролиферацию В-лимфоцитов (в опытах с продукцией антител к эритроцитам барана). Препарат не активировал патологические реакции клеточного звена иммунитета, что было показано в экспериментах с индукцией гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана, вводимых с полным адьювантом Фрейнда.

Аллергизирующие свойства комплекса – способность вызывать реакции гиперчувствительности немедленного и замедленного типов – исследовали на морских свинках и мышах. В обоих случаях интенсивность реакций оказалась незначительной, что позволило сделать вывод об отсутствии у него аллергизирующих свойств.

Таким образом, на первом этапе результаты проведенных экспериментов подтвердили безопасность комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина и открыли возможность дальнейшего исследования его влияния на формирование механизмов иммунной защиты.

С этой целью задачей настоящей работы стали особенности влияния исследуемого комплекса на врожденный иммунитет, отражающие его активацию *per se* и как условие формирования надежного адаптивного иммунитета.

Иммунизация комплексом рекомбинантных белков умеренно усиливала неспецифическую фагоцитарную активность гранулоцитов и макрофагов,

наиболее активно после первой иммунизации, постепенно снижаясь со временем. Этот факт свидетельствовал о долгосрочных изменениях функции фагоцитов, которые являются маркером активации врожденного иммунитета в ответ на введение препарата. Усиление захвата антигена антиген-представляющими клетками, такими как макрофаги и дендритные клетки, необходимо для эффективной его презентации В- и Т-лимфоцитам [117]. Способность моноцитов/макрофагов функционировать в качестве антиген-представляющих клеток и регулировать иммунный ответ хорошо изучена [74]. Активация нейтрофилов также играет важную роль не только в собственно фагоцитозе патогена, но и способствует целому ряду событий, запускающих процессы активации механизмов врожденного и адаптивного иммунитета [78, 161, 277].

В последнее время накопились данные, свидетельствующие, что нейтрофилы выполняют разнообразные функции, способствуя развитию адаптивного иммунного ответа, интернализуя и транспортируя антиген, функционируя в качестве антиген-представляющих клеток для Т-хелперов и оказывая широкие регуляторные воздействия [130, 147, 149, 163, 265, 277].

Также усиление фагоцитарной активности, пусть и краткосрочное, может быть полезно в профилактике, например, гнойно-воспалительных заболеваний, раневых инфекций и т.д., вызываемых как *P. aeruginosa*, так и другими бактериями. Как известно, бактерии *P. aeruginosa* уничтожаются преимущественно путем фагоцитоза [155].

Помимо фагоцитарной активности, после введения препарата усиливалась и способность фагоцитов к внутриклеточному киллингу бактерий, что также свидетельствовало об их активации. Поскольку *Pseudomonas aeruginosa* имеет ряд механизмов, противодействующих киллингу в лизосомах [52, 75, 100], усиление этой функции может оказаться полезным в иммунитете против этой бактерии, увеличивая готовность фагоцитов к встрече с ней. В настоящей работе выявлено, что усиление бактерицидного действия наблюдалось более интенсивно при иммунизации комплексом, а не белками-компонентами без адьюванта.

В экспериментах *in vitro* исследовано влияние комплекса рекомбинантных белков на созревание дендритных клеток, генерированных из костного мозга мышей. Дендритные клетки – важнейшие антиген-представляющие клетки, а поглощение и представление ими антигенов Т-клеткам является важнейшим звеном между активацией врожденного и приобретенного звеньев иммунного ответа, регулирующим взаимодействия между иммунными клетками посредством выделения цитокинов. В настоящее время известно, что существует несколько субтипов дендритных клеток в лимфоидных и нелимфоидных тканях млекопитающих, и эти клетки имеют различную функциональную специализацию.

После рецепции через паттерн-распознающие рецепторы и поглощения антигенов дендритные клетки проходят процесс созревания, приобретая способность индуцировать клональную экспансию антиген-специфических наивных Т-клеток и их сопутствующую дифференцировку в эффекторные Т-клетки. При этом происходит усиление экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости и костимулирующих молекул и секреция цитокинов, способствующих дифференциации Т-клеток и активации различных других типов иммунных клеток, а экспрессия паттерн-распознающих рецепторов, в т.ч. TLR, меняется [70].

Известно, что дендритные клетки играют одну из ключевых ролей в иммунном ответе на вакцинные антигены, и от особенностей их функции зависит формирование протективного иммунитета [183].

Проведенные эксперименты показали, что комплекс рекомбинантных белков вызывал созревание дендритных клеток, при этом в культуре нарастала доля клеток, экспрессирующих их функционально важные молекулы (маркер терминальной дифференцировки CD83, маркер клеточной адгезии CD38, главный комплекс гистосовместимости МНС II и его костимулирующие молекулы CD80 и CD86), при этом снижалась экспрессия ряда Toll-подобных рецепторов и рецептора к липополисахариду CD14, что свидетельствовало о возможных функциональных изменениях этих клеток с переходом от поглощения антигена к

его представлению Т-клеткам. Полученные данные вполне согласуются с известными по литературным данным особенностями созревания дендритных клеток. Исследования ряда используемых в клинической практике вакцин также показали их способность быть индукторами созревания этих клеток [235]. В настоящее время способность вакцин активировать дендритные клетки считается важным фактором формирования эффективного иммунного ответа, при этом его характер зависит от того, какие рецепторы дендритных клеток вакцины (а особенно адьюванты в их составе) способны стимулировать [119].

При этом в ходе созревания, дендритные клетки секретировали в среду разнообразные цитокины, индуцирующие в организме реакции активации эффекторов иммунной системы и регулирующие их взаимодействия. Большинство цитокинов имеют способность действовать одновременно на различные типы клеток и индуцировать в них разнообразные эффекты. Однако существуют классификации цитокинов по преимущественной функции, в частности, в отношении влияния на дифференцировку Т-хелперов; с другой стороны, этот и другие процессы индуцируются не одним, а одновременно разными стимулами [74]. Иммунологические механизмы формирования ответа на вакцинацию включают секрецию ряда цитокинов, регулирующих взаимодействия иммунных клеток [198, 209].

Среди цитокинов, уровень которых измеряли при выполнении настоящей работы, можно условно выделить несколько типов по их преимущественной функции. Так, значительно повышались уровни цитокинов, отвечающих за острую фазу воспаления, таких как IL-1 (это семейство цитокинов, состоящее из 11 схожих друг с другом членом, проявляющих провоспалительные свойства) и TNF- α . IL-1 α и IL-1 β имеющих мощное провоспалительное действие с широким диапазоном различных эффектов. Прежде всего, они являются индукторами пролиферации лимфоцитов, в том числе Т-хелперов различных функциональных подтипов, усиливают секрецию ряда других цитокинов и хемокинов [150]. Есть литературные данные, что они оба больше активируют Th2-лимфоциты, чем Th1,

при этом IL-1 β играет ключевую роль (вместе с TGF- β , TNF- α и IL-6) в индукции Th17-ответа [77, 228].

Получены результаты, свидетельствующие о секреции после введения комплекса рекомбинантных белков цитокинов, вызывающих дифференцировку Т-хелперов как по Th1- (такие как IL-12 и IFN- γ), так и по Th2- (IL-4, IL-6, IL-10 и IL-13) и Th17-путям (IL-1 β +IL-6+TNF- α), а также хемокинов (CXCL1, CCL3, CCL4, CCL5), привлекающих в очаг воспаления фагоциты. Долгое время не было сформировано определенного мнения, какая поляризация Т-хелперов нужна для эффективной защиты от *P. aeruginosa* [203]. В настоящее время считается, что она должна быть разнонаправленной и включать дифференцировку не только по Th 2-пути, стимулирующему гуморальный иммунный ответ, но также и по Th1 (клеточный) и особенно Th17-путям (индукция субтипа антиген-специфических Т-хелперов, способных при стимуляции антигеном эффективно рекрутировать фагоциты) [31]. Таким образом, в настоящей работе на модели *in vitro* установленный профиль секреции цитокинов дендритными клетками соответствует именно этому требованию. При этом более выраженные изменения иммунофенотипа и секреция цитокинов наблюдалась при применении комплекса рекомбинантных белков, адсорбированных на гидроксиде алюминия, по сравнению с белками-компонентами, что подчеркивает важность адьюванта в его составе [124].

Также исследовали влияние иммунизации комплексом на иммунофенотип лимфоцитов селезенки и секреции цитокинов *in vivo*. При исследовании иммунофенотипа лимфоцитов селезенки мышей отмечено увеличение доли в клеточной популяции Т-хелперов и В-лимфоцитов, снижение доли Т-киллеров, увеличение числа НК-клеток, а также клеток, позитивных по маркерам клеточной активации. Таким образом, выявленные изменения свидетельствуют об активации иммунного ответа, могут способствовать увеличению числа антителопродуцирующих клеток и уменьшению числа Т-киллеров (необходимых в основном для борьбы с вирусами), то есть к смещению баланса в сторону клеток, эффективных в борьбе с внеклеточными бактериями.

При изучении изменений цитокинового профиля периферической крови мышей при иммунизации комплексом рекомбинантных белков и изменений секреции цитокинов лимфоцитами селезенки при стимуляции им *in vivo* было отмечено повышение уровней провоспалительных цитокинов, Th1, Th2 и Th17 цитокинов, что согласуется с данными, полученными при стимуляции дендритных клеток *in vitro*. В обоих случаях изменения секреции цитокинов свидетельствовали об активации множественных путей дифференцировки Т-хелперов и различных эффекторов иммунитета. Введение препарата запускало процессы, аналогичные происходящим при инфекции, и приводящие к формированию адаптивного иммунитета к *P. aeruginosa*. Стоит подчеркнуть, что цитокиновый профиль свидетельствовал о стимуляции развития Th17-клеток, особенно важных в иммунном ответе на *P. aeruginosa*. В ряде современных работ, посвященных вакцинам против *P. aeruginosa*, были показаны схожие изменения секреции цитокинов [110, 171, 289].

Важным разделом исследования стало изучение особенностей адаптивного иммунного ответа. Изучен изотипический спектр антител, формируемых в ответ на иммунизацию комплексом рекомбинантных белков, и продолжительность иммунного ответа. Известно, что антигены белковой природы вызывают тимус-зависимый иммунный ответ с образованием IgG и иммунологической памяти. Показано, что на синтез тех или иных субклассов антител имеют влияние цитокины [60]: так, IL-4, направляя иммунный ответ по Th2 типу, вызывает переключение синтеза IgM на IgG1, а IFN- γ , поляризуя его по Th1-типу, способствует переключению синтеза IgM на продукцию IgG2a, IgG2b и IgG3 [57], а TGF- β индуцирует синтез IgG2b [185, 217]. Давно известно, что адьюванты на основе соединений алюминия в составе вакцин вызывают усиление иммунного ответа, в основном по Th2-типу, но результаты более поздних исследований показали, что они могут усиливать как Th1, так и Th2 клеточный ответ [113].

В проведенных экспериментах на сроке 3 недель после двукратной иммунизации комплексом рекомбинантных белков преобладали специфические антитела класса IgG, но сохранялись и антитела класса IgM. IgG-антитела были

представлены всеми субизотипами с преобладанием IgG1. Поскольку переключение антителообразующих клеток на синтез того или иного субизотипа зависит от действия цитокинов (а их выработка, в свою очередь, от природы антигенов и адъювантов), то полученные данные вполне согласуются с картиной секреции цитокинов, показывающей секрецию сразу по нескольким типам дифференцировки Т-клеток.

Исследование продолжительности иммунного ответа показало, что антитела в крови мышей, индуцированные введением комплекса рекомбинантных белков, сохраняются свыше 12 недель после двукратной иммунизации (срок наблюдения), однако имеют тенденцию к снижению титров. Впрочем, схожая картина наблюдается и при иммунизации мышей вакцинами, применяемыми в клинической практике [145, 242].

Протективную активность комплекса OprF и анатоксина исследовали на модели внутрибрюшинного заражения мышей живой культурой *P. aeruginosa*. Иммунизация комплексом рекомбинантных белков повышала резистентность животных к заражению (по показателю LD₅₀ возбудителя) примерно в три раза. Таким образом подтверждена специфическая активность препарата, а значит, целесообразность испытания его эффективности для человека.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что комплекс рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* безопасен и активирует различные эффекторы иммунного ответа против *P. aeruginosa*.

ВЫВОДЫ

1. Доказано отсутствие у комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* токсических, пирогенных, иммунотоксических и аллергизирующих свойств, что подтверждает его соответствие требованиям безопасности для иммунобиологических препаратов.
2. Установлено активирующее действие комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa* на эффекторы врожденного иммунитета, что проявлялось в усилении неспецифической фагоцитарной (до 1,82 раз) и бактерицидной (до 2,09 раз) активности лейкоцитов по отношению к гетерологичной бактерии *Staphylococcus aureus*.
3. Показана способность комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa* эффективно индуцировать созревание дендритных клеток *in vitro* с усилением экспрессии молекул презентации антигенов, снижением экспрессии TLR2/4 и липополисахаридных рецепторов CD14, а также секрецию ими цитокинов различных функциональных классов, в том числе острой фазы воспаления (IL-1, IL-6, TNF α), Th1- (IFN- γ , IL-12) и Th2-цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13), IL-17 и хемокинов (CXCL1, CCL3, CCL4, CCL5).
4. Показана стимуляция продукции *in vivo* цитокинов острой фазы, Th1-, Th2- и Th17 (IL-17, IL-21, IL-22) цитокинов, в особенности IL-17 (до 248 раз), при введении комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa*.
5. Выявлено действие комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa* на стимулированную фитогемагглютинином продукцию цитокинов спленоцитами мышей *in vitro*, при этом увеличивалась продукция цитокинов, индуцирующих дифференцировку Т-лимфоцитов (IL-12, IFN- γ), и уменьшалась продукция воспалительных и проаллергенных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-13).
6. Показано, что иммунизация лабораторных животных комплексом рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa* индуцировала изменения иммунофенотипа лимфоцитов селезенки за счет нарастания в 1,25 раза доли Т-хелперов, в 2,3 раза доли В-лимфоцитов и клеток с маркерами ранней и поздней активации, а также уменьшения в 1,47 раз доли цитотоксических лимфоцитов.
7. Установлено индуцирующее действие иммунизации животных комплексом рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa* на синтез специфических

антител к белкам OprF и анатоксину классов IgM и IgG (всех подклассов с преобладанием IgG1), сохранявшихся в крови до 12 недель после иммунизации (срок наблюдения).

8. Выявлены протективные свойства комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa*, увеличивавшего выживаемость иммунизированных мышей при внутрибрюшинном заражении живой вирулентной культурой возбудителя с индексом эффективности, равным 2,8 – 3,4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ашмарин И.П.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. / Ашмарин И.П., Воробьев А.А. // Ленинград: Медицинская литература, 1962. – 180 с.
2. *Благовидов Д.А.* Клинико-иммунологический эффект вакцинации против синегнойной инфекции у детей с муковисцидозом и врожденными пороками развития бронхов: специальности 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология», 14.01.08 «Педиатрия»: диссертация на соискание степени кандидата биологических наук / Благовидов Дмитрий Алексеевич; Москва, 2019.
3. *Гатыпова Е.В.* Получение рекомбинантных белков OprL и OprI наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммунобиологических свойств: специальность 03.00.03 «Молекулярная биология»: диссертация на соискание степени кандидата биологических наук / Гатыпова Екатерина Викторовна; Москва, 2009
4. ГОСТ Р 58173-2018 Средства лекарственные для медицинского применения. Исследования иммуотоксичности лекарственных средств, предназначенных для человека. // URL:
<http://protect.gost.ru/v.aspx?control=8&baseC=6&page=1&month=2&year=-1&search=&RegNum=1&DocOnPageCount=15&id=223340>. Дата обращения: 11.5.2021.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание. ОФС.1.2.4.0005.15 «Пирогенность». // URL:
http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/1245/index.html. Дата обращения: 11.5.2021.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание. ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины». // URL:
http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/1251/index.html. Дата обращения: 11.5.2021.

7. Едвабная Л.С. Белковые протективные антигены *Pseudomonas aeruginosa* / Едвабная Л.С., Зайднер И.Г., Макаренко Т.А., Булк В.Ф., Жванецкая М.И., Машилова Г.М., Станиславский Е.С. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1985. – 11. – с. 18-23
8. Злыгостев С. А. Оценка свойств рекомбинантного белка F наружной мембраны (OprF) *Pseudomonas aeruginosa* в эксперименте. / Злыгостев С. А., Гатауллин А. Г., Калошин А. А., Михайлова Н. А., Зверев В. В // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – 7. – с. 43-46.
9. Злыгостев С. А. Получение рекомбинантного белка внешней мембраны OprF *Pseudomonas aeruginosa* и изучение его иммунобиологических свойств: специальность 03.00.07 «Микробиология»: диссертация на соискание степени кандидата медицинских наук / Злыгостев Сергей Александрович; Москва, 2008.
10. Иванова А. С. Принципы оценки иммунологической безопасности фармацевтических продуктов. / Иванова А. С., Мастернак Т. Б., Малкина Е. Ю., Мартынов А. И. // Биомедицина. – 2011 – 3. – с. 94-97.
11. Исаков М.А. Иммунобиологические свойства рекомбинантных атотоксичных форм экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* / Исаков М.А., Солдатенкова А.С., Калошин А.А., Михайлова Н.А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – №2 – с. 37-42.
12. Исаков М.А. Получение рекомбинантного экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. / Исаков М.А., Калошин А.А., Михайлова Н.А. // Биотехнология. 2009. № 3. С. 29-33.
13. Исаков М.А. Получение рекомбинантных атотоксичных форм экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* и изучение их иммунобиологических свойств: специальность 03.02.03 «Микробиология»: диссертация на соискание степени кандидата биологических наук. / Исаков Михаил Андреевич. Москва, 2010.
14. Калошин А. А. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas*

- aeruginosa* / Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2016. – Т. 71. – № 1. – С. 5-10.
15. Калошин А. А. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. / Калошин А.А., Исаков М.А., Михайлова Н.А., Вертиев Ю.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154. – 9. – С. 330-335.
16. Калошин А. А. Получение рекомбинантного белка F наружной мембраны (OprF) *Pseudomonas aeruginosa* и изучение его антигенных свойств / Калошин А. А., Злыгостев С. А., Торопчина Ю. Н., Курбатова Е. А., Зверев В. В., Михайлова Н. А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – 5. – с. 50-53.
17. Калошин А. А. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств / Калошин А. А., Гатыпова Е. В., Михайлова Н. А. //Биотехнология. – 2011. – №. 2. – С. 74-74.
18. Клинические исследования вакцины Псевдовак [Электронный ресурс]. URL: <http://pseudovac.ru/clinical>. Дата обращения 12.5.2021
19. Макаренко Т.А. Белковые протективные антигены *P. aeruginosa*: специальность 14.00.36 «аллергология и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. / Макаренко Татьяна Александровна. Москва, 1994
20. Мартынов А.И. Принципы изучения иммунотоксического действия фармакологических препаратов / Мартынов А.И., Иванова А.С., Мастернав Т.Б. Токсикологический вестник. – 2010. – 5. – С.26-31.
21. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. / Под

редакцией А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2013. – 536 с. ISBN 978-5-8125-17667-0

22. Михайлова Н.А. Доклинические исследования рекомбинантной вакцины синегнойной. / Михайлова Н. А., Калошин А. А., Зимина Е. М., Солдатенкова А. В., Поддубиков А. В. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – 6. – с. 31-37.
23. Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств рекомбинантной атоксичной формы экзотоксина А и рекомбинантного белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa*. / Михайлова Н. А., Вертиев Ю. В., Калошин А. А., Исаков М. А. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – 2. – с.39-44.
24. Михайлова Н.А. Получение рекомбинантного белка I наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его иммуногенных и защитных свойств / Михайлова Н. А., Калошин А. А. //Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2012. – Т. 8. – №. 1. – С. 5-10.
25. Михайлова Н.А. Разработка вакцины на основе рекомбинантных антигенов синегнойной палочки. / Михайлова Н.А., Зимина Е.М., Солдатенкова А.В., Калошин А.А. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – 1. – с. 74-80.
26. Солдатенкова А. В. Влияние рекомбинантного анатоксина на эффекторы иммунного ответа у мышей / Солдатенкова А. В., Ахматова Н. К., Михайлова Н. А. // Иммунология. – 2012. –5. – С.245-249.
27. Abdi K. Free IL-12p40 monomer is a polyfunctional adaptor for generating novel IL-12-like heterodimers extracellularly. / Abdi K., Singh N.J., Spooner E., Kessler B.M., Radaev S., Lantz L., Xiao T.S., Matzinger P., Sun P.D., Ploegh H.L. // J Immunol. – 2014. –192(12). – p. 6028-6036.
DOI:10.4049/jimmunol.1400159
28. Arnold H. Enhanced immunogenicity in the murine airway mucosa with an attenuated *Salmonella* live vaccine expressing OprF-OprI from *Pseudomonas*

- aeruginosa*. / Arnold H., Bumann D., Felies M., Gewecke B., Sørensen M., Gessner J.E., Freihorst J., von Specht B.U., Baumann U. // *Infect Immun.* – 2004. – 72(11). – p. 6546-6553. DOI: 10.1128/IAI.72.11.6546-6553.2004
29. *Azghani A.O.* *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. / Azghani A.O., Idell S., Bains M., Hancock R.E. // *Microb Pathog.* – 2002. – 33(3). – p. 109-114. DOI: 10.1006/mpat.2002.0514
30. *Bajnok A.* The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia. / Bajnok A, Ivanova M, Rigó J Jr, Toldi G. // *Mediators Inflamm.* – 2017. – 2017:8045161. doi: 10.1155/2017/8045161
31. *Baker S.M.* Immunological considerations in the development of *Pseudomonas aeruginosa* vaccines. / Baker S.M., McLachlan J.B., Morici L.A. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2020. – 16(2). – p. 412-418. doi:10.1080/21645515.2019.1650999
32. *Bassetti M.* Rational approach in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. / Bassetti M., Vena A., Russo A., Croxatto A., Calandra T., Guery B. // *Curr Opin Infect Dis.* – 2018. – 6. – p. 578-586. doi:10.1097/QCO.0000000000000505
33. *Bassetti M.* How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. / Bassetti M., Vena A., Croxatto A., Righi E., Guery B. // *Drugs Context.* – 2018. – 7. – 212527. doi: 10.7573/dic.212527
34. *Baumann U.* Recombinant OprF-OprI as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections. / Baumann U., Mansouri E., von Specht B.U. // *Vaccine.* – 2004. – 22(7). – p. 840-847. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.11.029.
35. *Bayes H.K.* Interleukin-17 is required for control of chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. / Bayes H.K., Ritchie N.D., Evans T.J. // *Infect Immun.* – 2016. – 84(12). – p. 3507–3516. doi: 10.1128/IAI.00717-16.
36. *Bayes H.K.* T helper cell subsets specific for *Pseudomonas aeruginosa* in healthy individuals and patients with cystic fibrosis. / Bayes H.K., Bicknell S., MacGregor G., Evans T.J. // *PLoS One.* – 2014. – 9(2). – e90263. doi: 10.1371/journal.pone.0090263

37. *Bédard E. Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. / Bédard E., Prévost M., Déziel E. // *Microbiology open*. – 2016. – 5(6). – p. 937-956. doi: 10.1002/mbo3.391.
38. *Bedke N.* A method for the generation of large numbers of dendritic cells from CD34+ hematopoietic stem cells from cord blood. / Bedke N., Swindle E.J., Molnar C., Holt P.G., Strickland D.H., Roberts G.C., Morris R., Holgate S.T., Davies D.E., Blume C. // *J Immunol Methods*. – 2020. – 477. – p. 112703. DOI: 10.1016/j.jim.2019.112703
39. *Bedrossian N.* Inflammation and Elevation of Interleukin-12p40 in Patients with Schizophrenia. / Bedrossian N., Haidar M., Fares J., Kobeissy F.H., Fares Y. // *Front Mol Neurosci*. – 2016. – 9. – p. 16. doi: 10.3389/fnmol.2016.00016.
40. *Behrouz B.* Immunization with bivalent flagellin protects mice against fatal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. / Behrouz B., Hashemi F.B., Fatemi M.J., Naghavi S., Irajian G., Halabian R., Imani Fooladi A.A. // *J Immunol Res*. 2017; - 2017. – 5689709. DOI: 10.1155/2017/5689709
41. *Ben-Sasson S.Z.* IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. / Ben-Sasson S.Z., Hu-Li J., Quiel J., Cauchetaux S., Ratner M., Shapira I., Dinarello C.A., Paul W.E. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2009. – 106(17). – p. 7119-7124. doi: 10.1073/pnas.0902745106
42. *Bianconi I.* Genome-based approach delivers vaccine candidates against *Pseudomonas aeruginosa*. / Bianconi I., Alcalá-Franco B., Scarselli M., Dalsass M., Buccato S., Colaprico A., Marchi S., Masignani V., Bragonzi A. // *Front Immunol*. – 2019. – 9. – p. 3021. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03021
43. *Bitton G.* Encyclopedia of environmental microbiology / Gabriel Bitton. Includes bibliographical references and index. 2002. ISBN 0-471-35450-3 (set: cloth : alk.paper) — ISBN 0-471-36046-5 (v. 1) — ISBN 0-471-36047-3 (v. 2) — ISBN 0-471-36048-1 (v. 3) — ISBN 0-471-36049-X (v. 4) — ISBN 0-471-36050-3 (v. 5) — ISBN 0-471-36051-1 (v. 6)

44. *Bjornson A.B.* Contribution of humoral and cellular factors to the resistance to experimental infection by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. I. Interaction between immunoglobulins, heat-labile serum factors, and phagocytic cells in the killing of bacteria. / Bjornson A.B., Michael J.G. // *Infect Immun.* – 1971. –4(4). – p. 462-467. DOI: 10.1128/IAI.4.4.462-467.1971
45. *Blok B.A.* Trained innate immunity as underlying mechanism for the long-term, nonspecific effects of vaccines. / Blok B.A., Arts R.J., van Crevel R., Benn C.S., Netea M.G. // *J Leukoc Biol.* – 2015. – 98(3). – p. 347–356. DOI: 10.1189/jlb.5RI0315-096R.
46. *Botelho J.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. / Botelho J., Grosso F., Peixe L. // *Drug Resist Updat.* – 2019. –44. – p.100640. DOI: 10.1016/j.drug.2019.07.002
47. *Bukhari SI.* Association of OprF mutant and disturbance of biofilm and pyocyanin virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. / Bukhari SI, Aleanizy FS. // *Saudi Pharm J.* – 2020. – Feb;28(2). – pp.196-200. doi:10.1016/j.jsps.2019.11.021
48. *Burrows LL.* The Therapeutic Pipeline for *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *ACS Infect Dis.* – 2018. – Jul 13;4(7). – pp. 1041-1047. doi: 10.1021/acsinfecdis.8b00112.
49. *Cabral MP.* A live auxotrophic vaccine confers mucosal immunity and protection against lethal pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. / Cabral MP, Correia A, Vilanova M, Gärtner F, Moscoso M, García P, Vallejo JA, Pérez A, Francisco-Tomé M, Fuentes-Valverde V, Bou G. // *PLoS Pathog.* – 2020. – Feb 10;16(2). – e1008311. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008311
50. *Cassin EK.* Pushing beyond the envelope: the potential roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and pathogenicity. / Cassin EK, Tseng BS. // *J Bacteriol.* – 2019. – Aug 22;201(18). – e00050-19. doi: 10.1128/JB.00050-19.
51. *Caucheteux SM.* IL-1 β enhances inflammatory TH2 differentiation. / Caucheteux SM, Hu-Li J, Guo L, Bhattacharyya N, Crank M, Collins MT, Paul WE. // *J*

Allergy Clin Immunol. – 2016. – Sep;138(3). – pp.898-901.e4. DOI:
10.1016/j.jaci.2016.02.033

52. *Cavinato L*. Escaping the phagocytic oxidative burst: the role of SODB in the survival of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages. / Cavinato L, Genise E, Luly FR, Di Domenico EG, Del Porto P, Ascenzioni F. // Front Microbiol. – 2020. – Mar 10;11. – 326. doi: 10.3389/fmicb.2020.00326
53. *Chan YR*. Patients with cystic fibrosis have inducible IL-17+IL-22+ memory cells in lung draining lymph nodes. / Chan YR, Chen K, Duncan SR, Lathrop KL, Latoche JD, Logar AJ, Pociask DA, Wahlberg BJ, Ray P, Ray A, Pilewski JM, Kolls JK. // J Allergy Clin Immunol. – 2013. – Apr;131(4). – pp.1117-1129. doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.036.
54. *Chen K*. Th17 cells mediate clade-specific, serotype-independent mucosal immunity. / Chen K, McAleer JP, Lin Y, Paterson DL, Zheng M, Alcorn JF, Weaver CT, Kolls JK. // Immunity. – 2011. – Dec 23;35(6). – pp. 997-1009. doi: 10.1016/j.immuni.2011.10.018.
55. *Chen TY*. Recombinant protein composed of *Pseudomonas exotoxin A*, outer membrane proteins I and F as vaccine against *P. aeruginosa* infection. / Chen TY, Shang HF, Chen TL, Lin CP, Hui CF, Hwang J. // Appl Microbiol Biotechnol. – 1999. – Oct;52(4). – pp. 524-33. DOI: 10.1007/s002530051555
56. *Chevalier S*. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. / Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, Orange N, Dufour A, Cornelis P. // FEMS Microbiol Rev. – 2017. – Sep 1;41(5). – pp. 698-722. doi: 10.1093/femsre/fux020.
57. *Chu JQ*. Evaluation of protective immune response induced by a DNA vaccine encoding GRA8 against acute toxoplasmosis in a murine model. / Chu JQ, Huang S, Ye W, Fan XY, Huang R, Ye SC, Yu CY, Wu WY, Zhou Y, Zhou W, Lee YH, Quan JH. // Korean J Parasitol. – 2018. – 56(4). – pp. 325-334. doi: 10.3347/kjp.2018.56.4.325.
58. *Ciofu O*. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. / Ciofu O, Tolker-

- Nielsen T. // *Front Microbiol.* – 2019. – May 3;10. – 913.
doi:10.3389/fmicb.2019.00913.
59. *Clem AS.* Fundamentals of vaccine immunology. // *J Glob Infect Dis.* –2011. – 3(1). – pp. 73–78. doi:10.4103/0974-777X.77299
60. *Coffman R.L.* Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression. / Coffman R.L., Savelkoul H.F., Lebman D.A. // *Semin Immunol.* – 1989. –1. – pp. 55-63.
61. *Coin D.* A *Pseudomonas aeruginosa* alginate-exotoxin A conjugate that elicits anti-alginate and exotoxin A-neutralizing antibodies. / Coin D, Vacheron MJ, Guinand M, Michel G. // *FEMS Microbiol Immunol.* – 1991. – Aug;3(4). – pp. 185-92. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04213.x
62. *Collin M.* Human dendritic cell subsets. / Collin M, McGovern N, Haniffa M. // *Immunology.* – 2013. – Sep;140(1). – pp. 22-30. doi: 10.1111/imm.12117.
63. *Colvin KM.* The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. / Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, Howell PL, Wozniak DJ, Parsek MR. // *Environ Microbiol.* – 2012. – Aug;14(8). – pp. 1913-28. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x.
64. *Cooper AM.* IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. / Cooper AM, Khader SA. // *Trends Immunol.* – 2007. – Jan;28(1). – pp. 33-8. doi: 10.1016/j.it.2006.11.002.
65. *Crousilles A.* Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? / Crousilles A, Maunders E, Bartlett S, Fan C, Ukor EF, Abdelhamid Y, Baker Y, Floto A, Spring DR, Welch M. // *Future Microbiol.* – 2015. – 10(11). – pp. 1825-36. doi: 10.2217/fmb.15.100.
66. *Cruse J.M.* Cluster of differentiation (CD) antigens. *Immunology Guidebook.* 2004:47–124. Guest Editor (s): Julius M. Cruse, Robert E. Lewis, and Huan Wang. ISBN-10: 012198382X. ISBN-13: 978-0121983826. doi: 10.1016/B978-012198382-6/50027-3.

67. Cryz SJ Jr. A polyvalent *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. / Cryz SJ Jr, Fürer E, Sadoff JC, Germanier R. // *Antibiot Chemother* (1971). 1987/ – 39. – pp. 249-55. doi: 10.1159/000414350.
68. Cryz SJ Jr. Synthesis and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* alginate-toxin A conjugate vaccine. / Cryz SJ Jr, Fürer E, Que JU. // *Infect Immun*. – 1991. – Jan;59(1). – pp. 45-50. doi:10.1128/IAI.59.1.45-50.1991
69. Cryz SJ Jr. Use of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A in the construction of conjugate vaccines and immunotoxins. / Cryz SJ Jr, Fürer E, Sadoff JC, Germanier R, Pastan I, Willingham MC, FitzGerald DJ. // *Rev Infect Dis*. – 1987. – Sep-Oct;9 Suppl 5. – S644-9. doi: 10.1093/clinids/9.supplement_5.s644.
70. Dalod M. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. / Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. // *EMBO J*. – 2014. – May 16;33(10). – pp. 1104-16. doi: 10.1002/emboj.201488027.
71. De Bree LCJ. Non-specific effects of vaccines: Current evidence and potential implications. / de Bree LCJ, Koeken VACM, Joosten LAB, Aaby P, Benn CS, van Crevel R, Netea MG. // *Semin Immunol*. – 2018. – Oct;39. – pp. 35-43. doi: 10.1016/j.smim.2018.06.002.
72. De Temmerman ML. Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. / De Temmerman ML, Rejman J, Demeester J, Irvine DJ, Gander B, De Smedt SC. // *Drug Discov Today*. – 2011. – 16(13-14). – pp. 569–582. doi:10.1016/j.drudis.2011.04.006
73. Delamarre L. Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. / Delamarre L, Couture R, Mellman I, Trombetta ES. // *J Exp Med*. – 2006. – 203(9). – pp. 2049–2055. doi:10.1084/jem.20052442
74. Delves P. J. Roitt's essential immunology, 13th edition. / Delves P. J., Martin S. J., Burton D. R., Roitt, I. M. (2017). Publisher: Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. ISBN: 978-1-118-41577-1
75. Deng Q. *Pseudomonas aeruginosa* triggers macrophage autophagy to escape intracellular killing by activation of the NLRP3 inflammasome. / Deng Q, Wang

- Y, Zhang Y, Li M, Li D, Huang X, Wu Y, Pu J, Wu M. // *Infect Immun.* – 2015. – Oct 14;84(1). – pp. 56-66. doi: 10.1128/IAI.00945-15.
76. *Dettman JR.* Genome-wide patterns of recombination in the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. / Dettman JR, Rodrigue N, Kassen R. // *Genome Biol Evol.* – 2014. – Dec 4;7(1). – pp. 18-34. doi: 10.1093/gbe/evu260.
77. *Di Paolo NC.* Interleukin 1 α and the inflammatory process. / Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. // *Nat Immunol.* – 2016. – Jul 19;17(8). – pp. 906-13. doi: 10.1038/ni.3503.
78. *Di Pilato M.* Neutrophil and vaccine. / Di Pilato M, Esteban M. // *Cell Cycle.* – 2015. – 14(11). – pp. 1615-6. doi: 10.1080/15384101.2015.1039362.
79. *Dickerhof N.* Exposure of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal hypochlorous acid during neutrophil phagocytosis is compromised in cystic fibrosis. / Dickerhof N, Isles V, Pattemore P, Hampton MB, Kettle AJ. // *J Biol Chem.* – 2019. – 294(36). – pp. 13502-13514. doi:10.1074/jbc.RA119.009934
80. *Dienz O.* The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. / Dienz O, Rincon M. // *Clin Immunol.* – 2009. – Jan;130(1). – pp. 27-33. doi: 10.1016/j.clim.2008.08.018.
81. *Ding B.* OprF/I-vaccinated sera inhibit binding of human interferon-gamma to *Pseudomonas aeruginosa*. / Ding B, von Specht BU, Li Y. // *Vaccine.* – 2010. – Jun 7;28(25). – pp. 4119-22. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.04.028.
82. *Döring G.* Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. / Döring G, Pier GB. // *Vaccine.* – 2008. – Feb 20;26(8). – pp. 1011-24. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.12.007.
83. *Dubin PJ.* IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. / Dubin PJ, Kolls JK. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2006. – 292(2). – L519-28. doi: 10.1152/ajplung.00312.2006.
84. *Dubin PJ.* Interleukin-23-mediated inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. / Dubin PJ, Martz A, Eisenstatt JR, Fox MD, Logar A, Kolls JK. // *Infect Immun.* – 2012. – 80(1). – pp. 398-409. doi: 10.1128/IAI.05821-11

85. *Duraisingham SS. Pseudomonas* infection in antibody deficient patients. / Duraisingham SS, Hanson S, Buckland M, Grigoriadou S, Longhurst HJ. // *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. – 2014. – Dec;4(4). – pp. 198-203. doi: 10.1556/EUJMI-D-14-00026.
86. *Elhosary MA*. Immunization with the ferric iron-binding periplasmic protein HitA provides protection against *Pseudomonas aeruginosa* in the murine infection model. / Elhosary MA, Bahey-El-Din M, AbdelBary A, El Guink N, Aboushleib HM. // *Microb Pathog*. – 2019. – 131. – pp. 181–185. doi:10.1016/j.micpath.2019.04.014
87. *Faezi S*. Development of a novel anti-adhesive vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* targeting the C-terminal disulfide loop of the pilin protein. / Faezi S, Bahrmand AR, Mahdavi M, Siadat SD, Nikokar I, Sardari S. // *Int J Mol Cell Med*. – 2017. – Spring;6(2). – pp. 96-108. doi: 10.22088/acadpub.BUMS.6.2.4.
88. *Faezi S*. Preparation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-flagellin immunoconjugate. / Faezi S, Bahrmand AR, Mahdavi M, Siadat SD, Sardari S, Nikokar I, Khanaki K, Mirzajani E, Goudarzi G. *Biologicals*. // 2017. – May;47. – pp. 11-17. doi: 10.1016/j.biologicals.2017.04.001.
89. *Faezi S*. Protective efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* type-A flagellin in the murine burn wound model of infection. / Faezi S, Safarloo M, Amirmozafari N, Nikokar I, Siadat SD, Holder IA, Mahdavi M. // *APMIS*. – 2014. – Feb;122(2). – pp. 115-27. doi: 10.1111/apm.12101.
90. *Farajnia S*. Protective efficacy of recombinant exotoxin A-flagellin fusion protein against *Pseudomonas aeruginosa* infection. / Farajnia S, Peerayeh SN, Tanomand A, Majidi J, Goudarzi G, Naghili B, Rahbarnia L. // *Can J Microbiol*. – 2015. – Jan;61(1). – pp. 60-4. doi: 10.1139/cjm-2014-0501.
91. *Farjah A*. Immunological evaluation of an alginate-based conjugate as a vaccine candidate against *Pseudomonas aeruginosa*. / Farjah A, Owlia P, Siadat SD, Mousavi SF, Ardestani MS, Mohammadpour HK. // *APMIS*. – 2015. – Feb;123(2). – pp.175-83. doi: 10.1111/apm.12337.

92. *Fernandes PB*. Antibodies to cell envelope proteins of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. / Fernandes PB, Kim C, Cundy KR, Haung NN. // *Infect Immun.* – 1981. – Aug;33(2):527-32. doi: 10.1128/IAI.33.2.527-532.1981.
93. *Fito-Boncompte L*. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. / Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, Bazire A, Madi A, Connil N, Véron W, Taupin L, Toussaint B, Cornelis P, Wei Q, Shioya K, Déziel E, Feuilloley MG, Orange N, Dufour A, Chevalier S. // *Infect Immun.* – 2011. – Mar;79(3). – pp. 1176-86. doi: 10.1128/IAI.00850-10.
94. *Fogle MR*. Anti-ETA IgG neutralizes the effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. / Fogle MR, Griswold JA, Oliver JW, Hamood AN. // *J Surg Res.* – 2002. – Jul;106(1). – pp. 86-98. doi: 10.1006/jsre.2002.6433.
95. *Frimmersdorf E*. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. / Frimmersdorf E, Horatzek S, Pelnikevich A, Wiehlmann L, Schomburg D. // *Environ Microbiol.* – 2010. – Jun;12(6). – pp. 1734-47. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02253.x.
96. *Funken H*. Specific association of lectin LecB with the surface of *Pseudomonas aeruginosa*: role of outer membrane protein OprF. / Funken H, Bartels KM, Wilhelm S, Brocker M, Bott M, Bains M, Hancock RE, Rosenau F, Jaeger KE. // *PLoS One.* – 2012. – 7(10). – e46857. doi: 10.1371/journal.pone.0046857.
97. *Furman D*. New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection. / Furman D, Davis MM. // *Vaccine.* – 2015. – 33(40). – pp. 5271–5281. doi:10.1016/j.vaccine.2015.06.117
98. *Galassie AC*. Proteomic contributions to our understanding of vaccine and immune responses. / Galassie AC, Link AJ. // *Proteomics Clin Appl.* – 2015. – 9(11-12). – pp. 972–989. doi:10.1002/prca.201500054
99. *Gao C*. Vaccination with a recombinant OprL fragment induces a Th17 response and confers serotype-independent protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. / Gao C, Yang F, Wang Y, Liao Y, Zhang J, Zeng H, Zou Q,

- Gu J. // Clin Immunol. – 2017. – 183. – pp. 354–363.
doi:10.1016/j.clim.2017.09.022
100. Garai P. Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by mgtC and oprF mutants. / Garai P, Berry L, Moussouni M, Bleves S, Blanc-Potard AB. // PLoS Pathog. – 2019. – Jun 20;15(6). – e1007812. doi: 10.1371/journal.ppat.1007812.
101. Gardiner CM. The cells that mediate innate immune memory and their functional significance in inflammatory and infectious diseases. / Gardiner CM, Mills KH. // Semin Immunol. – 2016. – 28(4). – pp. 343–350.
doi:10.1016/j.smim.2016.03.001
102. Gellatly SL. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. / Gellatly SL, Hancock RE. // Pathog Dis. – 2013. – Apr;67(3). – pp. 159-73. doi: 10.1111/2049-632X.12033.
103. Gilleland HE. Outer membrane protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. / Gilleland HE, Jr, Gilleland LB, Matthews-Greer JM. // Infect Immun. – 1988. – 56. – pp. 1017–1022. doi: 10.1128/IAI.56.5.1017-1022.1988.
104. Gilleland HE. Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. / Gilleland HE, Jr, Parker MG, Matthews JM, Berg RD. // Infect Immun. 1984. – 44. – pp. 49–54. doi: 10.1128/IAI.44.1.49-54.1984.
105. Göcke K. Mucosal vaccination with a recombinant OprF-I vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy volunteers: comparison of a systemic vs. a mucosal booster schedule. / Göcke K, Baumann U, Hagemann H, Gabelsberger J, Hahn H, Freihorst J, von Specht BU. // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2003. – Jul 15;37(2-3). – pp. 167-71.
106. Grimwood K. Vaccination against respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. / Grimwood K, Kyd JM, Owen SJ, Massa HM, Cripps AW. // Hum Vaccin Immunother. – 2015. – 11(1). – pp. 14-20. doi: 10.4161/hv.34296.

107. *Han Y.* Human CD14+ CTLA-4+ regulatory dendritic cells suppress T-cell response by cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-dependent IL-10 and indoleamine-2,3-dioxygenase production in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* / Han Y, Chen Z, Yang Y, Jiang Z, Gu Y, Liu Y, Lin C, Pan Z, Yu Y, Jiang M, Zhou W, Cao X. // 2014. – Feb;59(2). – pp. 567-79. doi: 10.1002/hep.26694.
108. *Hancock RE.* Quantitation and identification of antibodies to outer-membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* in sera of patients with cystic fibrosis. / Hancock RE, Mouat EC, Speert DP. // *J Infect Dis.* – 1984. – Feb;149(2). – pp. 220-6. doi: 10.1093/infdis/149.2.220.
109. *Hari-Dass R.* Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. / Hari-Dass R, Shah C, Meyer DJ, Raynes JG. // *J Biol Chem.* – 2005. – May 13;280(19). – pp. 18562-7. doi: 10.1074/jbc.M500490200.
110. *Hashemi FB.* A trivalent vaccine consisting of "flagellin A+B and pilin" protects against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a murine burn model / Hashemi FB, Behrouz B, Irajian G, Laghaei P, Korpi F, Fatemi MJ. // *Microb Pathog.* – 2019. – 138. – 103697. doi:10.1016/j.micpath.2019.103697
111. *Hassan R.* Immunization with outer membrane proteins (OprF and OprI) and flagellin B protects mice from pulmonary infection with mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. / Hassan R, El-Naggar W, Abd El-Aziz AM, Shaaban M, Kenawy HI, Ali YM. // *J Microbiol Immunol Infect.* – 2018. – Jun;51(3). – pp. 312-320. doi: 10.1016/j.jmii.2016.08.014.
112. *Hatano K.* Complex serology and immune response of mice to variant high-molecular-weight O polysaccharides isolated from *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O2 strains. / Hatano K, Pier GB. // *Infect Immun.* – 1998. – Aug;66(8). – 3719-26. doi: 10.1128/IAI.66.8.3719-3726.1998.
113. *He P.* Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. / He P, Zou Y, Hu Z. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2015. – 11(2). – pp. 477-88. doi: 10.1080/21645515.2014.1004026.
114. *Hedstrom RC.* Antibody response of infected mice to outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. / Hedstrom RC, Pavlovskis OR, Galloway

- DR. // *Infect Immun.* – 1984. – Jan;43(1). – pp. 49-53. doi: 10.1128/IAI.43.1.49-53.1984.
115. *Hentzer M.* Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. / Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Høiby N, Givskov M. // *EMBO J.* – 2003. – Aug 1;22(15). – 3803-15. doi: 10.1093/emboj/cdg366.
116. *Hertle R.* Dual-function vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of chimeric exotoxin A-pilin protein. / Hertle R, Mrsny R, Fitzgerald DJ. // *Infect Immun.* – 2001. – Nov;69(11). – pp. 6962-9. doi: 10.1128/IAI.69.11.6962-6969.2001
117. *Hirayama D.* The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. / Hirayama D, Iida T, Nakase H. // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Dec 29;19(1). – p. 92. doi: 10.3390/ijms19010092.
118. *Hirche TO.* Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. / Hirche TO, Benabid R, Deslee G, Gangloff S, Achilefu S, Guenounou M, Lebargy F, Hancock RE, Belaaouaj A. // *J Immunol.* – 2008. – Oct 1;181(7). – pp. 4945-54. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4945.
119. *Ho NI.* Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: the key to more effective vaccines? / Ho NI, Huis In 't Veld LGM, Raaijmakers TK, Adema GJ. // *Front Immunol.* – 2018. – Dec 13;9. – p. 2874. doi: 10.3389/fimmu.2018.02874.
120. *Hoggarth A.* Mechanistic research holds promise for bacterial vaccines and phage therapies for *Pseudomonas aeruginosa*. / Hoggarth A, Weaver A, Pu Q, Huang T, Schettler J, Chen F, Yuan X, Wu M. // *Drug Des Devel Ther.* – 2019. – 13. – pp. 909–924. doi:10.2147/DDDT.S189847
121. *Holby N.* Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in serum from normal persons and patients colonized with mucoid or non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: Results obtained by crossed immunoelectrophoresis. // *Acta Pathol Microbiol Scand C.* – 1977. – Apr;85(2). – pp. 142-8.

122. *Horcajada JP*. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. / Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, Benito N, Grau S. // Clin Microbiol Rev. – 2019. – Aug 28;32(4). – e00031-19. doi: 10.1128/CMR.00031-19.
123. *Im YB*. Cytokines production and toll-like receptors expression in human leukemic monocyte cells, THP-1, stimulated with *Brucella abortus* cellular antigens. / Im YB, Shim S, Soh SH, Kim S, Yoo HS. // Microb Pathog. – 2018. – 122. – pp. 7–12. doi:10.1016/j.micpath.2018.06.007
124. *Iwakura Y*. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. / Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. // Immunol Rev. – 2008. – Dec;226. – pp. 57-79. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00699.x.
125. *Jakobsen TH*. Bacterial biofilm control by perturbation of bacterial signaling processes. / Jakobsen TH, Tolker-Nielsen T, Givskov M. // Int J Mol Sci. – 2017. – Sep 13;18(9). – 1970. doi: 10.3390/ijms18091970.
126. *Javanmardi F*. A systematic review and meta-analysis on Exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. / Javanmardi F, Emami A, Pirbonyeh N, Keshavarzi A, Rajaei M. // Infect Genet Evol. – 2019. – Nov;75. –104037. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104037.
127. *Jensen PØ*. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. / Jensen PØ, Givskov M, Bjarnsholt T, Moser C. // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2010. – 59(3). – pp. 292-305. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00706.x
128. *Jerne NK*. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. / Jerne NK, Nordin AA. // Science. – 1963. – Apr 26;140(3565). – 405. doi: 10.1126/science.140.3565.405.
129. *Johansen HK*. Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. / Johansen HK, Gøtzsche PC. // Cochrane Database

Syst Rev. – 2015. – Aug 23;2015(8). – CD001399. doi:
10.1002/14651858.CD001399.pub4.

130. *Kambayashi T.* Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? / Kambayashi T, Laufer TM. // Nat Rev Immunol. – 2014. – Nov;14(11). – pp.719-30. doi: 10.1038/nri3754.
131. *Kamei A.* Collaboration between macrophages and vaccine-induced CD4+ T cells confers protection against lethal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during neutropenia. / Kamei A, Wu W, Traficante DC, Koh AY, Van Rooijen N, Pier GB, Priebe GP. // J Infect Dis. – 2013. – Jan 1;207(1). – pp. 39-49. doi: 10.1093/infdis/jis657.
132. *Kamei A.* Mucosal vaccination with a multivalent, live-attenuated vaccine induces multifactorial immunity against *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection. / Kamei A, Coutinho-Sledge YS, Goldberg JB, Priebe GP, Pier GB. // Infect Immun. – 2011. – Mar;79(3). – pp. 1289-99. doi: 10.1128/IAI.01139-10.
133. *Kazemi Moghaddam E.* Conserved OprF as a selective immunogen against *Pseudomonas aeruginosa*. / Kazemi Moghaddam E, Owlia P, Jahangiri A, Rasooli I, Rahbar MR, Aghajani M. // Iran J Pathol. – 2017. – Spring;12(2). – pp. 165-170.
134. *Kharazmi, A.* Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. // Immunol Lett. – 1991. – Oct;30(2). – pp. 201-5. doi: 10.1016/0165-2478(91)90026-7.
135. *Khosravi AD.* The frequency of genes encoding exotoxin A and exoenzyme S in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. / Khosravi AD, Shafie F, Abbasi Montazeri E, Rostami S. // Burns. – 2016. – Aug;42(5). – pp. 1116-1120. doi: 10.1016/j.burns.2016.02.012.
136. *Kim H.* Development of a novel hybrid antimicrobial peptide for targeted killing of *Pseudomonas aeruginosa*. / Kim H, Jang JH, Kim SC, Cho JH. // Eur J Med Chem. – 2020. – 185. – 111814. doi:10.1016/j.ejmech.2019.111814

137. King PT. *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection: Is this important in bronchiectasis and COPD? // *Respirology*. – 2019. – Oct;24(10). – pp. 926-927. doi: 10.1111/resp.13578.
138. Knapp B. A recombinant hybrid outer membrane protein for vaccination against *Pseudomonas aeruginosa*. / Knapp B, Hundt E, Lenz U, Hungerer KD, Gabelsberger J, Domdey H, Mansouri E, Li Y, von Specht BU. // *Vaccine*. – 1999. – Mar 26;17(13-14). – pp. 1663-6. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00420-4.
139. Knirel YA. Polysaccharide antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. // *Crit Rev Microbiol*. – 1990. – 17(4). – pp. 273-304. doi: 10.3109/10408419009105729.
140. Kolpen M. Nitric oxide production by polymorphonuclear leucocytes in infected cystic fibrosis sputum consumes oxygen. / Kolpen M, Bjarnsholt T, Moser C, Hansen CR, Rickelt LF, Kühl M, Hempel C, Pressler T, Høiby N, Jensen PØ. // *Clin Exp Immunol*. – 2014. – Jul;177(1). – pp. 310-9. doi: 10.1111/cei.12318.
141. Krause A. Protective anti-*Pseudomonas aeruginosa* humoral and cellular mucosal immunity by AdC7-mediated expression of the *P. aeruginosa* protein OprF. / Krause A, Whu WZ, Xu Y, Joh J, Crystal RG, Worgall S. // *Vaccine*. – 2011. – 29. – pp. 2131–2139. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.087
142. Krishnan S. Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. / Krishnan S, Prasadarao NV. // *FEBS J*. – 2012. – Mar;279(6). – pp. 919-31. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08482.x.
143. Kumar S. Bacterial protein toll-like-receptor agonists: a novel perspective on vaccine adjuvants. / Kumar S, Sunagar R, Gosselin E. // *Front Immunol*. – 2019. – 10. – 1144. doi:10.3389/fimmu.2019.01144
144. Lavoie EG. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. / Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI. // *Microbes Infect*. – 2011. – 13(14-15). – pp. 1133-45.
145. Lee CJ. Protective immunity of pneumococcal glycoconjugates. / Lee CJ, Lee LH, Frasch CE. // *Crit Rev Microbiol*. – 2003. – 29(4). – pp. 333-49. doi: 10.1080/713608018.

146. Lee K. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a programmed bacterial life for fitness. / Lee K, Yoon SS. // J Microbiol Biotechnol. – 2017. – Jun 28;27(6). – pp.1053-1064. doi: 10.4014/jmb.1611.11056.
147. Leliefeld PH. How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. / Leliefeld PH, Koenderman L, Pillay J. // Front Immunol. – 2015. – Sep 14;6. – 471. doi: 10.3389/fimmu.2015.00471.
148. Leonard WJ. IL-21 Signaling in Immunity. / Leonard WJ, Wan CK. // F1000Res. 2016. – Feb 26;5F1000 – Faculty Rev-224. doi: 10.12688/f1000research.7634.1.
149. Li Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. / Li Y, Wang W, Yang F, Xu Y, Feng C, Zhao Y. // Cell Commun Signal. – 2019. – Nov 14;17(1). – 147. doi: 10.1186/s12964-019-0471-y.
150. Li Y. X-ray irradiated vaccine confers protection against pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. / Li Y, Wang Z, Liu X, Tang J, Peng B, Wei Y. // Sci Rep. – 2016. – 6. – 18823. doi:10.1038/srep18823.
151. Liang C. [Construction of recombinant Bb(pGEX-OprF-I) vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* and its protection elicited in mice]. / Liang C, Li W. // Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 2019. – Jul;35(7). – pp. 589-594.
152. Lin CK. Inflammation: a double-edged sword in the response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. / Lin CK, Kazmierczak BI. // J Innate Immun. – 2017. – 9(3). – pp. 250-261.
153. Liu C. Construction of a protective vaccine against lipopolysaccharide-heterologous *Pseudomonas aeruginosa* strains based on expression profiling of outer membrane proteins during infection. / Liu C, Pan X, Xia B, Chen F, Jin Y, Bai F, Priebe G, Cheng Z, Jin S, Wu W. // Front Immunol. – 2018. – Jul 26;9. – 1737. doi: 10.3389/fimmu.2018.01737.
154. Liu J. Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. / Liu J, Feng Y, Yang K, Li Q, Ye L, Han L, Wan H. // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2011. – Mar;61(2). – pp.179-88. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00764.x.

155. Lovewell RR. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. / Lovewell RR, Patankar YR, Berwin B. // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. – 2014. – 306(7). – L591-603. doi: 10.1152/ajplung.00335.2013.
156. Lukac M. Toxoid of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A generated by deletion of an active-site residue. / Lukac M, Pier GB, Collier RJ. // Infect Immun. – 1988. – Dec;56(12). – pp. 3095-8. doi: 10.1128/IAI.56.12.3095-3098.1988.
157. Lydick E. Responses of adult volunteers to a *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin-A vaccine. / Lydick E, Mclean AA, Woodhour AF, Callahan LT 3rd. // J Infect Dis. – 1985. – Feb;151(2). – p. 375. doi: 10.1093/infdis/151.2.375.
158. Maldonado RF. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. / Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. // FEMS Microbiol Rev. // 2016. – Jul;40(4). – pp. 480-93. doi: 10.1093/femsre/fuw007.
159. Manafi A. Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model. / Manafi A, Kohanteb J, Mehrabani D, Japoni A, Amini M, Naghmachi M, Zaghi AH, Khalili N. // BMC Microbiol. – 2009. – Feb 1;9. – 23. doi: 10.1186/1471-2180-9-23.
160. Mansouri E. Clinical study to assess the immunogenicity and safety of a recombinant *Pseudomonas aeruginosa* OprF-OprI vaccine in burn patients. / Mansouri E, Blome-Eberwein S, Gabelsberger J, Germann G, von Specht BU. // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2003. – Jul 15;37(2-3). – pp. 161-6. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00072-5.
161. Mantovani A. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. / Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. // Nat Rev Immunol. – 2011. – Jul 25;11(8). – pp. 519-31. doi: 10.1038/nri3024.
162. Mathee K. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. / Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, Qiu X, Matewish JM, Koehrsen M, Rokas A, Yandava CN, Engels R, Zeng E, Olavarietta R, Doud M, Smith RS,

- Montgomery P, White JR, Godfrey PA, Kodira C, Birren B, Galagan JE, Lory S.
// Proc Natl Acad Sci USA. – 2008. – Feb 26;105(8). –pp. 3100-5. doi:
10.1073/pnas.0711982105.
163. *Matsushima H*. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. / Matsushima H, Geng S, Lu R, Okamoto T, Yao Y, Mayuzumi N, Kotol PF, Chojnacki BJ, Miyazaki T, Gallo RL, Takashima A. // Blood. – 2013. – Mar 7;121(10). – pp. 1677-89. doi: 10.1182/blood-2012-07-445189.
164. *Matsuzaki G*. Interleukin-17 family cytokines in protective immunity against infections: role of hematopoietic cell-derived and non-hematopoietic cell-derived interleukin-17s. / Matsuzaki G, Umemura M. // Microbiol Immunol. – 2018. – Jan;62(1). – pp. 1-13. doi: 10.1111/1348-0421.12560.
165. *Matthews-Greer JM*. Outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine against heterologous immunotype strains in a burned mouse model. / Matthews-Greer JM, Gilleland HE., Jr. // J Infect Dis. –1987. – 155. – pp. 1282–1291. doi: 10.1093/infdis/155.6.1282.
166. *Mauch RM*. Mechanisms of humoral immune response against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection in cystic fibrosis. / Mauch RM, Jensen PØ, Moser C, Levy CE, Høiby N. // J Cyst Fibros. – 2018. –17(2). –pp. 143-152. doi:10.1016/j.jcf.2017.08.012
167. *Maurice NM*. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. / Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2018. – Apr;58(4). – pp. 428-439. doi: 10.1165/rcmb.2017-0321TR.
168. *McAllister F*. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. / McAllister F, Henry A, Kreindler JL, Dubin PJ, Ulrich L, Steele C, Finder JD,

- Pilewski JM, Carreno BM, Goldman SJ, Pirhonen J, Kolls JK. / J Immunol. – 2005. – Jul 1;175(1). – pp. 404-12. doi: 10.4049/jimmunol.175.1.404.
169. Merakou C. Progress toward the elusive *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. / Merakou C, Schaeffers MM, Priebe GP. // Surg Infect (Larchmt). – 2018. – Nov/Dec;19(8). – pp. 757-768. doi: 10.1089/sur.2018.233.
170. Meshulam T. Serum-induced lysis of *Pseudomonas aeruginosa*. / Meshulam T, Verbrugh H, Verhoef J. // Eur J Clin Microbiol. – 1982. – Feb;1(1). – pp. 1-6. doi: 10.1007/BF02014132.
171. Meynet E. Killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa*-based vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. / Meynet E, Laurin D, Lenormand JL, Camara B, Toussaint B, Le Gouëllec A. // Vaccine. – 2018. – 36(14). – pp. 1893–1900. doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.040
172. Michalkiewicz J. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on IFN-gamma synthesis: expression of costimulatory molecules on monocytes and activity of NK cells. / Michalkiewicz J, Stachowski J, Barth C, Patzer J, Dzierzanowska D, Madaliński K. // Immunol Lett. – 1999. – Sep 1;69(3). – pp. 359-66. doi: 10.1016/s0165-2478(99)00121-2.
173. Michalska M. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. / Michalska M., Wolf P. // Front Microbiol. – 2015. – Sep 15;6. – 963. doi: 10.3389/fmicb.2015.00963.
174. Michelim L. Current status of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. / Michelim L, Medeiros GS, Zavascki AP. // Curr Pharm Biotechnol. –2013. – 14(11). – pp. 951–959. doi:10.2174/1389201014666131226143923
175. Miller LA. The best defense is a good (protease) offense: how *Pseudomonas aeruginosa* evades mucosal immunity in the lung. // Virulence. – 2017. – 8(6). – pp. 625–627. doi: 10.1080/21505594.2016.1278335.
176. Mishra M. Identification of OprF as a complement component C3 binding acceptor molecule on the surface of *Pseudomonas aeruginosa*. / Mishra M,

- Ressler A, Schlesinger LS, Wozniak DJ. // *Infect Immun.* – 2015. – Aug;83(8). – pp. 3006-14. doi: 10.1128/IAI.00081-15.
177. *Mittal R.* Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* enters and survives inside macrophages. / Mittal R, Lisi CV, Kumari H, Grati M, Blackwelder P, Yan D, Jain C, Mathee K, Weckwerth PH, Liu XZ. // *Front Microbiol.* – 2016. – Nov 18;7. – 1828. doi: 10.3389/fmicb.2016.01828
178. *Miyoshi-Akiyama T.* Emergence and spread of epidemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. / Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Ohmagari N, Viet Hung N, Tharavichitkul P, Pokhrel BM, Gniadkowski M, Shimojima M, Kirikae T. // *Genome Biol Evol.* – 2017. – Dec 1;9(12). – pp. 3238-3245. doi: 10.1093/gbe/evx243.
179. *Molae N.* Evolution of the immune response against recombinant proteins (TcpA, TcpB, and FlaA) as a candidate subunit cholera vaccine. / Molae N, Mosayebi G, Amozande-Nobaveh A, Soleyman MR, Abtahi H. // *J Immunol Res.* – 2017. – 2017:2412747. doi:10.1155/2017/2412747.
180. *Montor WR.* Genome-wide study of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein immunogenicity using self-assembling protein microarrays. / Montor WR, Huang J, Hu Y, Hainsworth E, Lynch S, Kronish JW, Ordonez CL, Logvinenko T, Lory S, LaBaer J. // *Infect Immun.* – 2009. – Nov;77(11). – pp. 4877-86. doi: 10.1128/IAI.00698-09.
181. *Moore LS.* A clinical approach to managing *Pseudomonas aeruginosa* infections. / Moore LS, Cunningham J, Donaldson H. // *Br J Hosp Med (Lond).* – 2016. – Apr;77(4). – C50-4. doi: 10.12968/hmed.2016.77.4.C50.
182. *Moradali MF.* *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. / Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – 7. – 39. doi:10.3389/fcimb.2017.00039
183. *Morel PA.* Designing the optimal vaccine: the importance of cytokines and dendritic cells. / Morel PA, Turner MS. // *Open Vaccine J.* – 2010. v3. – pp. 7-17. doi: 10.2174/1875035401003010007.

184. Moseley TA. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. / Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. // Cytokine Growth Factor Rev. – 2003. – Apr;14(2). – pp. 155-74.
185. Mountford AP. The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni*. / Mountford AP, Fisher A, Wilson RA. // Parasite Immunol. – 1994. – Oct;16(10). – pp. 521-7. doi: 10.1111/j.1365-3024.1994.tb00306.x.
186. Murphy K. Janeway's Immunobiology, Ninth Edition. / Murphy K, Weaver C. // 2016. – Garland Science: New York, New York. ISBN: (Paperback) 978-0815345053.
187. Musich T. Neutrophil vaccination dynamics and their capacity to mediate B cell help in *Rhesus* macaques. / Musich T, Rahman MA, Mohanram V, Miller-Novak L, Demberg T, Venzon DJ, Felber BK, Franchini G, Pavlakis GN, Robert-Guroff M. // J Immunol. – 2018. – Oct 15;201(8). – pp. 2287-2302. doi: 10.4049/jimmunol.1800677.
188. Mutharia LM. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. / Mutharia LM, Nicas TI, Hancock RE. // J Infect Dis. – 1982. – Dec;146(6). – pp. 770-9. doi: 10.1093/infdis/146.6.770.
189. Naito Y. The protective effects of nasal PcrV-CpG oligonucleotide vaccination against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. / Naito Y, Hamaoka S, Kinoshita M, Kainuma A, Shimizu M, Katoh H, Moriyama K, Ishii KJ, Sawa T. // Microbiol Immunol. 2018. – Dec;62(12). – pp. 774-785. doi: 10.1111/1348-0421.12658.
190. NCBI Gene. CD14 CD14 molecule [Homo sapiens (human)] URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/929>. Дата обращения: 11.05.2021
191. Netea MG. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. / Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ. // Science. – 2016. – Apr 22;352(6284). – aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098.

192. *Painter RG*. The role of chloride anion and CFTR in killing of *Pseudomonas aeruginosa* by normal and CF neutrophils. / Painter RG, Bonvillain RW, Valentine VG, Lombard GA, LaPlace SG, Nauseef WM, Wang G. // *J Leukoc Biol.* – 2008. – Jun;83(6). – pp. 1345-53. doi: 10.1189/jlb.0907658.
193. *Palavutitotai N*. Epidemiology and risk factors of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. / Palavutitotai N, Jitmuang A, Tongchai S, Kiratisin P, Angkasekwinai N. // *PLoS One.* – 2018. – Feb 22;13(2). – e0193431. doi: 10.1371/journal.pone.0193431.
194. *Pan T*. IL17-Producing $\gamma\delta$ T cells may enhance humoral immunity during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. / Pan T, Tan R, Li M, Liu Z, Wang X, Tian L, Liu J, Qu H. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2016. – 6. – 170. doi:10.3389/fcimb.2016.00170
195. *Parkins MD*. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. / Parkins MD, Somayaji R, Waters VJ. // *Clin Microbiol Rev.* – 2018. – Aug 29;31(4). – e00019-18. doi: 10.1128/CMR.00019-18.
196. *Passos da Silva D*. The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix. / Passos da Silva D, Matwchuk ML, Townsend DO, Reichhardt C, Lamba D, Wozniak DJ, Parsek MR. // *Nat Commun.* – 2019. – May 16;10(1). – 2183. doi: 10.1038/s41467-019-10201-4.
197. *Pastan I*. Immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin A: a short history. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2003. – 52. – pp. 338-341. doi: 10.1007/s00262-002-0353-8.
198. *Pellegrino P*. Vaccine-drug interactions: cytokines, cytochromes, and molecular mechanisms. / Pellegrino P, Perrotta C, Clementi E, Radice S. // *Drug Saf.* – 2015. – Sep;38(9). – pp. 781-7. doi: 10.1007/s40264-015-0330-8.
199. *Peluso L*. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by recombinant OprF-pulsed dendritic cell immunization. / Peluso L, de Luca C, Bozza S, Leonardi A, Giovannini G, Lavorgna A, De Rosa G, Mascolo

- M, Ortega De Luna L, Catania MR, Romani L, Rossano F. // BMC Microbiol. – 2010. – Jan 13;10. – 9. doi: 10.1186/1471-2180-10-9.
200. *Pérez-Pérez M.* Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: new insights through network mining. / Pérez-Pérez M, Jorge P, Pérez Rodríguez G, Pereira MO, Lourenço A. // Biofouling. – 2017. – Feb;33(2). – pp. 128-142. doi: 10.1080/08927014.2016.1272104.
201. *Perrie Y.* Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. / Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. // Int J Pharm. – 2008. – Dec 8;364(2). – pp. 272-80. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.04.036.
202. *Pier GB.* Promises and pitfalls of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide as a vaccine antigen. // Carbohydr Res. – 2003. – Nov 14;338(23). – pp. 2549-56. doi: 10.1016/s0008-6215(03)00312-4.
203. *Pier GB.* *Pseudomonas aeruginosa*. / Pier GB, Ramphal R. // В книге Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / [edited by] Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin.—7th ed. p. ; cm. Includes bibliographical references and index. ISBN 978-0-4430-6839-3 New York, 2010.
204. *Pier GB.* Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. / Pier GB, Coleman F, Grout M, Franklin M, Ohman DE. // Infect Immun. – 2001. – Mar;69(3). – pp. 1895-901. doi: 10.1128/IAI.69.3.1895-1901.2001.
205. *Pletz MW.* Vaccines against major ICU pathogens: where do we stand? / Pletz MW, Uebele J, Götz K, Hagel S, Bekeredjian-Ding I. // Curr Opin Crit Care. – 2016. – Oct;22(5). – pp. 470-6. doi: 10.1097/MCC.0000000000000338.
206. *Price BM.* Enhancement of the protective efficacy of an oprF DNA vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. / Price BM, Barten Legutki J, Galloway DR, von Specht BU, Gilleland LB, Gilleland HE Jr, Staczek J. // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2002. – Jun 3;33(2). – pp. 89-99. doi: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00577.x.

207. *Priebe GP*. IL-17 is a critical component of vaccine-induced protection against lung infection by lipopolysaccharide-heterologous strains of *Pseudomonas aeruginosa*. / Priebe GP, Walsh RL, Cederroth TA, Kamei A, Coutinho-Sledge YS, Goldberg JB, Pier GB. // *J Immunol*. – 2008. – Oct 1;181(7). – pp. 4965-75. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4965
208. *Priebe GP*. Vaccines for *Pseudomonas aeruginosa*: a long and winding road. / Priebe GP, Goldberg JB. // *Expert Rev Vaccines*. – 2014. – Apr;13(4). – pp. 507-19. doi: 10.1586/14760584.2014.890053.
209. *Pulendran B*. Immunological mechanisms of vaccination. / Pulendran B, Ahmed R. // *Nat Immunol*. – 2011. – Jun;12(6). – pp. 509-17. doi: 10.1038/ni.2039.
210. *Qian F*. Conjugating recombinant proteins to *Pseudomonas aeruginosa* ExoProtein A: a strategy for enhancing immunogenicity of malaria vaccine candidates. / Qian F, Wu Y, Muratova O, Zhou H, Dobrescu G, Duggan P, Lynn L, Song G, Zhang Y, Reiter K, MacDonald N, Narum DL, Long CA, Miller LH, Saul A, Mullen GE. // *Vaccine*. – 2007. – May 16;25(20). – pp. 3923-33. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.073
211. *Quigley KJ*. Chronic infection by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* associated with dysregulation in T-cell immunity to outer membrane porin F. / Quigley KJ, Reynolds CJ, Goudet A, Raynsford EJ, Sergeant R, Quigley A, Worgall S, Bilton D, Wilson R, Loebinger MR, Maillere B, Altmann DM, Boyton RJ. // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2015. – Jun 1;191(11). – pp. 1250-64. doi: 10.1164/rccm.201411-1995OC.
212. *Quintin J*. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. / Quintin J, Cheng SC, van der Meer JW, Netea MG. // *Curr Opin Immunol*. – 2014. – 29. – 1–7. doi:10.1016/j.coi.2014.02.006
213. *Rada B*. Interactions between neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathogens*. – 2017. – Mar 9;6(1). – pii: E10. doi: 10.3390/pathogens6010010.

214. *Raman G.* Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. / Raman G, Avendano EE, Chan J, Merchant S, Puzniak L. // Antimicrob Resist Infect Control. – 2018. – Jul 4;7. – 79. doi: 10.1186/s13756-018-0370-9.
215. *Rappuoli R.* Will systems biology deliver its promise and contribute to the development of new or improved vaccines? Systems biology views of vaccine innate and adaptive immunity. / Rappuoli R, Siena E, Finco O. // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2018. – Aug 1;10(8). – pii: a029256. doi: 10.1101/cshperspect.a029256.
216. *Rashid MI.* Prediction of vaccine candidates against *Pseudomonas aeruginosa*: An integrated genomics and proteomics approach. / Rashid MI, Naz A, Ali A, Andleeb S. // Genomics. – 2017. – 109(3-4). – pp. 274–283. doi:10.1016/j.ygeno.2017.05.001
217. *Ratcliffe MJH, ed.* Encyclopedia of Immunobiology. 2016. Oxford: Academic Press, p.3126, ISBN 0080921523, 9780080921525.
218. *Restrepo MI.* Burden and risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia: a multinational point prevalence study of hospitalised patients. / Restrepo MI, Babu BL, Reyes LF, Chalmers JD, Soni NJ, Sibila O, Faverio P, Cilloniz C, Rodriguez-Cintron W, Aliberti S; GLIMP. // Eur Respir J. – 2018. – Aug 9;52(2). – pii: 1701190. doi: 10.1183/13993003.01190-2017.
219. *Reusch RN.* Biogenesis and functions of model integral outer membrane proteins: *Escherichia coli* OmpA and *Pseudomonas aeruginosa* OprF. // FEBS J. – 2012. – Mar;279(6). – 893. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08486.x.
220. *Ruiz-Garbajosa P.* Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. / Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. // Rev Esp Quimioter. – 2017. – Sep;30 Suppl 1. – pp. 8-12.
221. *Rybtke M.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. / Rybtke M, Hultqvist

- LD, Givskov M, Tolker-Nielsen T. // J Mol Biol. – 2015. – Nov 20;427(23). – pp. 3628-45. doi: 10.1016/j.jmb.2015.08.016.
222. *Ryu JI*. Increased immunogenicity and protective efficacy of a *P. aeruginosa* vaccine in mice using an alum and de-O-acylated lipooligosaccharide adjuvant system. / Ryu JI, Wui SR, Ko A, Lee YJ, Do H, Kim HJ, Rhee IM, Park SA, Kim KS, Cho YJ, Lee NG. // J Microbiol Biotechnol. – 2017. – Aug 28;27(8). – pp. 1539-1548. doi: 10.4014/jmb.1706.06009.
223. *Saadatian-Elahi M*. Heterologous vaccine effects. / Saadatian-Elahi M, Aaby P, Shann F, Netea MG, Levy O, Louis J, Picot V, Greenberg M, Warren W. // Vaccine. – 2016. – Jul 25;34(34). – pp. 3923-30. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.06.020.
224. *Sadikot RT*. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. / Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. // Am J Respir Crit Care Med. – 2005. – Jun 1;171(11). – pp. 1209-23. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO.
225. *Safari Zanjani L*. Exotoxin A-PLGA nanoconjugate vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection: protectivity in murine model. / Safari Zanjani L, Shapouri R, Dezfulian M, Mahdavi M, Shafiee Ardestani M. // World J Microbiol Biotechnol. – 2019. – Jun 11;35(6). – 94. doi: 10.1007/s11274-019-2669-y.
226. *Sallusto F*. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. / Sallusto F, Lanzavecchia A. // Arthritis Res. – 2002. – 4 Suppl 3(Suppl 3). – S127-32. doi: 10.1186/ar567.
227. *Sánchez-Ramón S*. Trained immunity-based vaccines: a new paradigm for the development of broad-spectrum anti-infectious formulations. / Sánchez-Ramón S, Conejero L, Netea MG, Sancho D, Palomares Ó, Subiza JL. // Front Immunol. – 2018. – 9. – 2936. doi:10.3389/fimmu.2018.02936
228. *Santarlaschi V*. IL-1 and T-helper immune responses. / Santarlaschi V, Cosmi L, Maggi L, Liotta F, Annunziato F. // Front Immunol. – 2013. – Jul 15;4. – 182. doi: 10.3389/fimmu.2013.00182.

229. *Savoia D.* New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. // *Future Microbiol.* – 2014. – 9(7). – pp. 917-28. doi: 10.2217/fmb.14.42.
230. *Schaad UB.* Safety and immunogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* conjugate A vaccine in cystic fibrosis. / *Schaad UB, Lang AB, Wedgwood J, Ruedeberg A, Que JU, Fürer E, Cryz SJ Jr.* // *Lancet.* – 1991. – Nov 16;338(8777). – pp. 1236-7. doi: 10.1016/0140-6736(91)92103-9.
231. *Schaeffers MM.* PLGA-encapsulation of the *Pseudomonas aeruginosa* PopB vaccine antigen improves Th17 responses and confers protection against experimental acute pneumonia. / *Schaeffers MM, Duan B, Mizrahi B, Lu R, Reznor G, Kohane DS, Priebe GP.* // *Vaccine.* – 2018. – Nov 12;36(46). – pp. 6926-6932. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.10.010.
232. *Scheiblhofer S.* Influence of protein fold stability on immunogenicity and its implications for vaccine design. / *Scheiblhofer S, Laimer J, Machado Y, Weiss R, Thalhamer J.* // *Expert Rev Vaccines.* – 2017. – 16(5). – pp. 479–489. doi:10.1080/14760584.2017.1306441
233. *Schiller NL.* Characterization of the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to complement-mediated killing: role of antibodies to the rough lipopolysaccharide on serum-sensitive strains. // *Infect Immun.* – 1988. – Mar;56(3). – pp. 632-9. doi: 10.1128/IAI.56.3.632-639.1988.
234. *Schiller NL.* Serum sensitivity of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strain. / *Schiller NL, Alazard MJ, Borowski RS.* // *Infect Immun.* – 1984. – Sep;45(3). – pp. 748-55. doi: 10.1128/IAI.45.3.748-755.1984.
235. *Schreibelt G.* Commonly used prophylactic vaccines as an alternative for synthetically produced TLR ligands to mature monocyte-derived dendritic cells. / *Schreibelt G, Benitez-Ribas D, Schuurhuis D, Lambeck AJ, van Hout-Kuijer M, Schaft N, Punt CJ, Figdor CG, Adema GJ, de Vries IJ.* // *Blood.* – 2010. – Jul 29;116(4). – pp. 564-74. doi: 10.1182/blood-2009-11-251884.
236. *Schuster M.* Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. / *Schuster M,*

- Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. // J Bacteriol. – 2003. – Apr;185(7). – pp. 2066-79. doi: 10.1128/jb.185.7.2066-2079.2003.
237. Schütt C. CD14. // Int J Biochem Cell Biol. – 1999. – May;31(5). – pp. 545-9. doi: 10.1016/s1357-2725(98)00153-8.
238. Secher T. The anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody Panobacumab is efficacious on acute pneumonia in neutropenic mice and has additive effects with meropenem. / Secher T, Fas S, Fauconnier L, Mathieu M, Rutschi O, Ryffel B, Rudolf M. // PLoS One. – 2013. – Sep 2;8(9). – e73396. doi: 10.1371/journal.pone.0073396.
239. Sen-Kilic E. Intranasal peptide-based FpvA-KLH conjugate vaccine protects mice from *Pseudomonas aeruginosa* acute murine pneumonia. / Sen-Kilic E, Blackwood CB, Boehm DT, Witt WT, Malkowski AC, Bevere JR, Wong TY, Hall JM, Bradford SD, Varney ME, Damron FH, Barbier M. // Front Immunol. – 2019. – Oct 23;10. – 2497. doi: 10.3389/fimmu.2019.02497.
240. Sharma A. Recent developments for *Pseudomonas* vaccines. / Sharma A, Krause A, Worgall S. // Hum Vaccin. – 2011. – Oct;7. – pp. (10)999-1011. doi: 10.4161/hv.7.10.16369.
241. Sidney LE. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. / Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. // Stem Cells. – 2014. – Jun;32(6). – pp. 1380-9. doi: 10.1002/stem.1661.
242. Silva GP. Short-term and long-term antibody response by mice after immunization against *Neisseria meningitidis* B or diphtheria toxoid. / Silva GP, Cruz SC, Cruz AC, Milagres LG. // Braz J Med Biol Res. – 2013. – Feb;46(2). – pp. 148-53. doi: 10.1590/1414-431x20122556.
243. Solanki V. Prioritization of potential vaccine targets using comparative proteomics and designing of the chimeric multi-epitope vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. / Solanki V, Tiwari M, Tiwari V. // Sci Rep. – 2019. – 9(1). – 5240. doi:10.1038/s41598-019-41496-4.

244. *Soldevila G*. The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. / Soldevila G, Raman C, Lozano F. // *Curr Opin Immunol.* – 2011. – Jun;23(3). – pp. 310-8. doi: 10.1016/j.coi.2011.03.003.
245. *Spagnuolo L*. The host genetic background defines diverse immune-reactivity and susceptibility to chronic *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection. / Spagnuolo L, De Simone M, Lorè NI, De Fino I, Basso V, Mondino A, Cigana C, Bragonzi A. // *Sci Rep.* – 2016. – 6. – 36924. doi:10.1038/srep36924
246. *Stanislavsky ES*. Clinico-immunological trials of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. / Stanislavsky ES, Balayan SS, Sergienko AI, Makarenko TA, Edvabnaya LS, Krohina MA, Rusanov VM. // *Vaccine.* – 1991. – Jul;9(7). – pp. 491-4. doi: 10.1016/0264-410x(91)90034-4.
247. *Stanislavsky ES*. Experimental studies on the protective efficacy of a *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. / Stanislavsky ES, Edvabnaya LS, Bandman OA, Book VF, Zhvanetskaya MI, Vargina AK. // *Vaccine.* – 1989. – Dec;7(6). – pp. 562-6. doi: 10.1016/0264-410x(89)90284-3.
248. *Stanislavsky ES*. Immunochemical and immunological study of cell-wall proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. / Stanislavsky ES, Edvabnaya LS, Zaidher IG, Makarenko TA, Bulk VF, Zhvanetskaya MI, Mashilova GM. // *Acta Microbiol Hung.* – 1986. – 33(3). – pp. 245-55.
249. *Stanislavsky ES*. *Pseudomonas aeruginosa* antigens as potential vaccines. / Stanislavsky ES, Lam JS. // *FEMS Microbiol Rev.* – 1997. – Nov;21(3). – pp. 243-77. doi: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00353.x.
250. *Stinnett JD*. Outer (cell wall) membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. / Stinnett JD, Eagon RG. // *Can J Microbiol.* – 1973. – Dec;19(12). – pp. 1469-71. doi: 10.1139/m73-239.
251. *Stover CK*. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. / Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL,

- Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. // Nature. – 2000. – Aug 31;406(6799). – pp. 959-64. doi: 10.1038/35023079.
252. *Tanomand A.* Cloning, expression and characterization of recombinant exotoxin A-flagellin fusion protein as a new vaccine candidate against *Pseudomonas aeruginosa* infections. / Tanomand A, Farajnia S, Najar Peerayeh S, Majidi J. // Iran Biomed J. – 2013. – 17(1). – pp. 1-7. doi: 10.6091/ibj.22.2012.
253. *Thema N.* Cellular immune responses induced in vitro by *Ehrlichia ruminantium* secreted proteins and identification of vaccine candidate peptides. / Thema N, Pretorius A, Tshilwane SI, Liebenberg J, Steyn H, van Kleef M. // Onderstepoort J Vet Res. – 2016. – 83(1). – e1–e11. doi:10.4102/ojvr.v83i1.1170
254. *Thomassen MJ.* Serum bactericidal effect on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. / Thomassen MJ, Demko CA. // Infect Immun. – 1981. – Aug;33(2). – pp. 512-8. doi: 10.1128/IAI.33.2.512-518.1981.
255. *Tolker-Nielsen T.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. // APMIS Suppl. – 2014. – Dec;(138). – pp. 1-51. doi: 10.1111/apm.12335.
256. *Töpfer E.* Innate immune memory: the latest frontier of adjuvanticity. / Töpfer E, Boraschi D, Italiani P. // J Immunol Res. – 2015. – 2015:478408. doi:10.1155/2015/478408
257. *Tümmler B.* Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*. // F1000Res. – 2019. – Aug 7;8. – F1000 Faculty Rev-1371. doi: 10.12688/f1000research.19509.1.
258. *Turkina MV.* Bacteria-host crosstalk: sensing of the quorum in the context of *Pseudomonas aeruginosa* infections. / Turkina MV, Vikström E. // J Innate Immun. – 2019. – 11(3). – pp. 263-279. doi: 10.1159/000494069.
259. *Unnikrishnan M.* Recombinant bacterial vaccines. / Unnikrishnan M, Rappuoli R, Serruto D. // Curr Opin Immunol. – 2012. – 24(3). – pp. 337–342. doi:10.1016/j.coi.2012.03.013.

260. *Valentini M.* Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. / Valentini M, Gonzalez D, Mavridou DA, Filloux A. // *Curr Opin Microbiol.* – 2018. – Feb;41. – pp. 15-20. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.006.
261. *Van de Weert-van Leeuwen PB.* Optimal complement-mediated phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by monocytes is cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent. / Van de Weert-van Leeuwen PB, Van Meegen MA, Speirs JJ, Pals DJ, Rooijackers SH, Van der Ent CK, Terheggen-Lagro SW, Arets HG, Beekman JM. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2013. – Sep;49(3). – 463-70. doi: 10.1165/rcmb.2012-0502OC.
262. *Vitkauskiene A.* *Pseudomonas aeruginosa* strains from nosocomial pneumonia are more serum resistant than *P. aeruginosa* strains from noninfectious respiratory colonization processes. / Vitkauskiene A, Scheuss S, Sakalauskas R, Dudzevicius V, Sahly H. // *Infection.* – 2005. – Oct;33(5-6). – pp. 356-61. doi: 10.1007/s15010-005-5044-x.
263. *Von Specht BU.* Immunogenic efficacy of differently produced recombinant vaccines candidates against *Pseudomonas aeruginosa* infections. / von Specht BU, Gabelsberger J, Knapp B, Hundt E, Schmidt-Pilger H, Bauernsachs S, Lenz U, Domdey H. // *J Biotechnol.* – 2000. – Sep 29;83(1-2). – pp. 3-12. doi: 10.1016/s0168-1656(00)00311-4.
264. *Von Specht BU.* Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccine candidates. / von Specht BU, Domdey H, Schödel F, Blum B, Lücking C, Knapp B, Muth G, Hungerer KD, Bröker M. // *Behring Inst Mitt.* – 1994. – 95. – pp. 85–96.
265. *Vono M.* Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4⁺ T cells in vitro and ex vivo. / Vono M, Lin A, Norrby-Teglund A, Koup RA, Liang F, Loré K. *Blood.* // 2017. – Apr 6;129(14). – pp. 1991-2001. doi: 10.1182/blood-2016-10-744441.
266. *Weimer ET.* A fusion protein vaccine containing OprF epitope 8, OprI, and type A and B flagellins promotes enhanced clearance of nonmucoid

- Pseudomonas aeruginosa*. / Weimer ET, Lu H, Kock ND, Wozniak DJ, Mizel SB. // *Infect Immun*. – 2009. – Jun;77(6). – pp. 2356-66. doi: 10.1128/IAI.00054-09.
267. Weimer ET. Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. / Weimer ET, Ervin SE, Wozniak DJ, Mizel SB. // *Vaccine*. – 2009. – Nov 12;27(48). –pp. 6762-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.08.080.
268. Westritschnig K. A randomized, placebo-controlled phase I study assessing the safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* hybrid outer membrane protein OprF/I vaccine (IC43) in healthy volunteers. / Westritschnig K, Hochreiter R, Wallner G, Firbas C, Schwameis M, Jilma B. // *Hum Vaccin Immunother*. – 2014. – 10(1). – pp. 170–183. doi:10.4161/hv.26565
269. Williams BJ. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. / Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. // *Respirology*. – 2010. – Oct;15(7). – pp. 1037-56. doi: 10.1111/j.1440-1843.2010.01819.x.
270. Wolf L. IL-17A-mediated expression of epithelial IL-17C promotes inflammation during acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. / Wolf L, Sapich S, Honecker A, Jungnickel C, Seiler F, Bischoff M, Wonnenberg B, Herr C, Schneider-Daum N, Lehr CM, Bals R, Beisswenger C. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2016. – Nov 1;311(5). – L1015-L1022. doi: 10.1152/ajplung.00158.2016.
271. Wonnenberg B. IL-17A attracts inflammatory cells in murine lung infection with *P. aeruginosa*. / Wonnenberg B, Jungnickel C, Honecker A, Wolf L, Voss M, Bischoff M, Tschernig T, Herr C, Bals R, Beisswenger C. // *Innate Immun*. – 2016. – Nov;22(8). – pp. 620-625. doi: 10.1177/1753425916668244.
272. Worgall S. 40 years on: have we finally got a vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*? // *Future Microbiol*. – 2012. – Dec;7(12). – pp. 1333-5. doi: 10.2217/fmb.12.106.

273. Worgall S. Protective immunity to *Pseudomonas aeruginosa* induced with a capsid-modified adenovirus expressing *P. aeruginosa* OprF. / Worgall S, Krause A, Qiu J, Joh J, Hackett NR, Crystal RG. // J Virol. – 2007. – Dec;81(24). – 13801-8. doi: 10.1128/JVI.01246-07.
274. Wu L. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. / Wu L, Estrada O, Zaborina O, Bains M, Shen L, Kohler JE, Patel N, Musch MW, Chang EB, Fu YX, Jacobs MA, Nishimura MI, Hancock RE, Turner JR, Alverdy JC. // Science. – 2005. – Jul 29;309(5735). – pp. 774-7. doi: 10.1126/science.1112422.
275. Wu W. Th17-stimulating protein vaccines confer protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. / Wu W, Huang J, Duan B, Traficante DC, Hong H, Risech M, Lory S, Priebe GP. // Am J Respir Crit Care Med. – 2012. – 186(5). – pp. 420-7. doi: 10.1164/rccm.201202-0182OC.
276. Xu X. Role of Interleukin-17 in defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection in lungs. / Xu X, Shao B, Wang R, Zhou S, Tang Z, Lu W, Xiong S. // Int J Clin Exp Med. – 2014. – Apr 15;7(4). – pp. 809-16.
277. Yang CW. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. / Yang CW, Strong BS, Miller MJ, Unanue ER. // J Immunol. – 2010. – 185(5). – pp. 2927–2934. doi:10.4049/jimmunol.1001289
278. Yang F. Protective efficacy of the trivalent *Pseudomonas aeruginosa* vaccine candidate PcrV-OprI-Hcp1 in murine pneumonia and burn models. / Yang F, Gu J, Yang L, Gao C, Jing H, Wang Y, Zeng H, Zou Q, Lv F, Zhang J. // Sci Rep. – 2017. – Jun 21;7(1). – 3957. doi: 10.1038/s41598-017-04029-5.
279. Yang J. Cell-penetrating peptides: efficient vectors for vaccine delivery. / Yang J, Luo Y, Shibu MA, Toth I, Skwarczynska M. // Curr Drug Deliv. – 2019. – 16(5). – pp. 430–443. doi:10.2174/1567201816666190123120915
280. Ye P. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. / Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL,

- Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. // *J Exp Med.* – 2001. – Aug 20;194(4). – pp. 519-27. doi: 10.1084/jem.194.4.519.
281. Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. / Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit TR, Gardner PR, Schwab U, Rowe JJ, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hancock RE, Parsek MR, Noah TL, Boucher RC, Hassett DJ. // *Dev Cell.* – 2002. – Oct;3(4). – pp. 593-603. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00295-2.
282. Young LS. Human immunity to *Pseudomonas aeruginosa*. I. In-vitro interaction of bacteria, polymorphonuclear leukocytes, and serum factors. / Young LS, Armstrong D. // *J Infect Dis.* – 1972. – Sep;126(3). – pp. 257-76. doi: 10.1093/infdis/126.3.257.
283. Young LS. Human immunity to *Pseudomonas aeruginosa*. II. Relationship between heat-stable opsonins and type-specific lipopolysaccharides. // *J Infect Dis.* – 1972. – Sep;126(3). – pp. 277-87. doi: 10.1093/infdis/126.3.277.
284. Young LS. Role of antibody in infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. // *J Infect Dis.* – 1974. – Nov;130 Suppl(0):S111-8. doi: 10.1093/infdis/130.supplement.s111.
285. Young RL. Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. / Young RL, Malcolm KC, Kret JE, Caceres SM, Poch KR, Nichols DP, Taylor-Cousar JL, Saavedra MT, Randell SH, Vasil ML, Burns JL, Moskowitz SM, Nick JA. // *PLoS One.* – 2011. – 6(9). – e23637. doi: 10.1371/journal.pone.0023637.
286. Yu X. Yu X, A DNA vaccine encoding VP22 of herpes simplex virus type I (HSV-1) and OprF confers enhanced protection from *Pseudomonas aeruginosa* in mice. / Wang Y, Xia Y, Zhang L, Yang Q, Lei J. // *Vaccine.* – 2016. – Aug 17;34(37). – pp. 4399-405. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.07.017.

287. Zhang J. Prophylactic and therapeutic protection of human IgG purified from sera containing anti-exotoxin A titers against pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. / Zhang J, Wan C, Yu B, Gao C, Zhao L, Cheng X, Yang F, Gu H, Zou Q, Gu J, Wang X. // Hum Vaccin Immunother. –2019. – 15(12). – pp. 2993-3002. doi: 10.1080/21645515.2019.1619404.
288. Zhang M. *Salmonella Typhimurium* strain expressing OprF-OprI protects mice against fatal infection by *Pseudomonas aeruginosa*. / Zhang M, Sun C, Gu J, Yan X, Wang B, Cui Z, Sun X, Tong C, Feng X, Lei L, Han W. // Microbiol Immunol. – 2015. – Sep;59(9). – pp. 533-44. doi: 10.1111/1348-0421.12291.
289. Zhang X. Immunization with *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles stimulates protective immunity in mice. / Zhang X, Yang F, Zou J, Wu W, Jing H, Gou Q, Li H, Gu J, Zou Q, Zhang J. // Vaccine. – 2018. – Feb 14;36(8). – pp. 1047-1054. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.01.034.