

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

На правах рукописи



Жеребцов Антон Павлович

**Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и
исследование его иммунологических свойств**

1.5.11. Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Михайлова Наталья Александровна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Факторы вирулентности, антибиотикоустойчивость <i>P. aeruginosa</i> и профилактика синегнойной инфекции	16
1.2. Бактериальные жгутики: их структура и функции.....	28
1.3. Применение флагеллина в составе вакцинных препаратов	32
1.4. Заключение по обзору литературы.....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1. Материалы исследования.....	41
2.1.1. Используемые штаммы	41
2.1.2. Используемые плазмиды	41
2.1.3. Экспериментальные животные.....	41
2.2. Методы исследования	42
2.2.1. Генно-инженерные технологии получения рекомбинантного флагеллина.....	42
2.2.2. Биологические методы анализа	50
2.2.3. Иммунохимические методы изучения рекомбинантного флагеллина	53
2.2.4. Статистические методы	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	63
3.1. Клонирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих рекомбинантный белок флагеллин <i>P. aeruginosa</i>	63
3.2. Очистка рекомбинантного флагеллина <i>P. aeruginosa</i>	69
3.3. Исследование иммунобиологических свойств рекомбинантного флагеллина <i>P. aeruginosa</i>	74
3.3.1. Изучение токсичности рекомбинантного флагеллина <i>P. aeruginosa</i>	74
3.3.2. Исследование иммуногенных свойств рекомбинантного флагеллина <i>P. aeruginosa</i>	75
3.3.3. Изучение адъювантных свойств флагеллина <i>P. aeruginosa</i>	80

3.4. Получение моноклональных антител к рекомбинантному флагеллину <i>P. aeruginosa</i> и их иммунохимическое исследование	83
3.4.1. Получение моноклональных антител к рекомбинантному флагеллину <i>P. aeruginosa</i>	83
3.4.2. Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител	85
3.4.3. Разработка иммуноферментного анализа для выявления рекомбинантного флагеллина <i>P. aeruginosa</i>	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
ВЫВОДЫ	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	101
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) условно-патогенная грамотрицательная подвижная неспорообразующая бактерия, имеющая ряд факторов вирулентности, играющих роль в развитии инфекции [37, 58]. Известно, что *P. aeruginosa* продуцирует многочисленные внеклеточные факторы, такие как: эластаза, экзотоксин-А, липополисахарид, а также некоторые штаммы вырабатывают гемолизины, лейкоцидин, и ферменты агрессии (плазмокоагулазы, протеазы, антиэластазы) [127]. Особую роль играет жгутик *P. aeruginosa*, основным структурным компонентом которого является белок флагеллин, участвующий в биопленкообразовании, обеспечивающий способность к колонизации и длительной персистенции возбудителя [46, 148]. Кроме того, важной особенностью *P. aeruginosa*, является наличие механизмов формирования лекарственной устойчивости за счет низкой проницаемости цитоплазматической мембраны, ограничивающей проникновение антибиотиков; активных эффлюкс-насосов, выводящих широкий спектр антимикробных препаратов (например, фторхинолоны, β -лактамы) из клетки; выработки инактивирующих ферментов, таких как β -лактамазы и карбапенемазы, которые расщепляют молекулы антибиотиков, а также мутации хромосомных генов [65, 77, 102].

В подавляющем большинстве случаев *P. aeruginosa* вызывает острые или хронические инфекции у лиц с ослабленным иммунитетом, обусловленным различными техногенными, наследственными, травматическими и другими факторами. Возбудитель может являться причиной первичных бактериемий, инфекций мочеполовой системы, гнойных послеоперационных и ожоговых инфекций [66, 153, 187]. *P. aeruginosa* входит в число наиболее часто встречающихся патогенов, вызывающих внутрибольничные инфекции. Важно отметить, что *P. aeruginosa* включена ВОЗ в «критическую» группу. Данные

обстоятельства обуславливают актуальность разработки препаратов для иммунопрофилактики и иммунотерапии заболеваний, вызываемых данным микроорганизмом [162].

В последние десятилетия разработано несколько вариантов различных вакцин для активной иммунизации против *P. aeruginosa*. Основу таких препаратов составляют следующие антигены: липополисахарид, поверхностные полисахариды, полисахарид - белковые конъюгаты, белки жгутика, белки наружной мембраны, пили, целые инактивированные формалином клетки, экстракты белков клеточной стенки, живые аттенуированные клетки *P. aeruginosa*, слитые белки и синтетические пептиды, несущие протективные эпитопы [128]. С учетом того, что *P. aeruginosa* обладает многочисленными факторами патогенности, не изучив вклад каждого из них в формировании иммунитета, невозможно создание вакцины, обеспечивающей формирование полноценного специфического иммунитета [100]. В настоящее время для конструирования вакцин все большее внимание уделяется использованию генно-инженерных методов, суть которых заключается во встраивании генов, отвечающих за синтез протективных антигенов возбудителя в геном непатогенной бактерии (например, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и др.) [67, 82, 121]. При культивировании продуцентов синтезируется искомый продукт, который подвергается очистке и далее изучаются его иммунобиологические и иммунохимические свойства, которые определяют целесообразность его включения в состав вакцины.

Ранее в лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова получены рекомбинантные белки OprF, OprI и делеционный вариант экзотоксина А (далее - aTox), обладающие иммуногенностью и проявляющие защитные свойства от экспериментальной синегнойной инфекции [10, 33, 51, 52]. Также наработаны слитые (гибридные) рекомбинантные белки OprF-OprI и OprF-aTox [29], которые оказались более эффективными при иммунизации. Однако рекомбинантный белок OprF-aTox обладал существенным недостатком, поскольку при его синтезе образовывались укороченные варианты

искомого белка, что вызывало затруднения при стандартизации будущего вакцинного препарата.

При разработке вакцинных препаратов важным аспектом является правильный подбор адъюванта, увеличивающего эффективность вакцинации [90, 190]. В настоящее время в качестве перспективного адъюванта рассматривают флагеллин. Он является основным структурным компонентом жгутика бактерии и агонистом толл-подобного рецептора 5 врожденной иммунной системы [68]. Образование комплекса флагеллин – TLR5 вызывает активацию Т-клеточного ответа, а именно Т-хелперов. Толл-подобный рецептор 5 связывает флагеллин бактерий и активирует противовоспалительный фактор транскрипции NF- κ B через адаптерный белок MyD88, который вызывает продукцию противовоспалительных цитокинов [95].

Молекула флагеллина содержит два высококонсервативных домена (D0 и D1), составляющих (N и C) концевые участки протеина и центральный гипервариабельный домен (D2/D3), обеспечивающие стабилизацию филаментов бактериальных жгутиков за счет гидрофобных взаимодействий между субъединицами белка [95]. Распознавание флагеллина рецепторами TLR5 осуществляется N-концевым участком домена D1, образованным 90-97 аминокислотными остатками; 35 аминокислотных остатков C-терминального участка полипептидной последовательности ответственны за связывание флагеллина с рецепторами NAIP5 [183]. Домен D2/D3 имеет различия по аминокислотному составу, размеру у разных штаммов и видов бактерий [159].

Ряд экспериментов показали, что использование высококонсервативных доменов флагеллина, в качестве молекулярного адъюванта в составе вакцины повышает экспрессию молекул CD80, CD83, CD86 и MHCII на поверхности дендритных клеток, а также приводит к увеличению секреции ИФН- γ и α -дефенсинов дендритными и NK-клетками; Т-клеточную пролиферацию и активацию антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, а также повышенную индукцию антиген-специфических IgG и IgA антител [104, 140]. Данные эффекты показаны в исследованиях экспериментальных вакцин против

Y. pestis [69, 108] и вируса Западного Нила [71]. Основным преимуществом флагеллина является его применение в виде гибридных белков в составе фьюжн-вакцин совместно с рекомбинантными антигенами. Такие вакцины индуцируют более мощную выработку антигенспецифичных IgG антител (в 10 раз и более), по сравнению с одновременным совместным введением флагеллина и антигенов [124]. Данный подход был использован при изучении экспериментальных вакцин против гриппа в доклинических и I фазе клинических испытаний VAX 125 (ClinicalTrials.gov NCT00730457), а также в вакцинах против малярии [124] и даже против кариеса [111]. В ходе I фазы клинических испытаний, при иммунизации вакцинами на основе таких гибридных белков, побочные эффекты не обнаружены. При исследовании ДНК-вакцины, кодирующей белок SARS-CoV-2S1, слитый с рекомбинантным флагеллином *Salmonella typhimurium* для профилактики и лечения COVID-19, получены данные, свидетельствующие что данная вакцина индуцирует долгосрочный гуморальный иммунитет на мышинной модели [101].

Однако, в настоящее время, несмотря на многочисленные исследования, иммуногенный и адъювантный потенциал флагеллина *P. aeruginosa* остаются до конца не изученными.

Таким образом, значение флагеллина, как фактора патогенности, в развитии синегнойной инфекции, показывает целесообразность изучения возможности создания вакцины против *P. aeruginosa*, имеющей в своем составе рекомбинантный флагеллин, как для стимуляции специфического иммунитета, так и в качестве адъюванта для усиления протективных свойств других компонентов гибридных белков. При этом иммуностимулирующие домены флагеллина возможно использовать не только в составе антисинегнойной вакцины, но и применять как адъювант в составе вакцин против других патогенов.

Степень разработанности темы исследования

Синегнойная палочка (лат. *Pseudomonas aeruginosa*) – это аэробная грамотрицательная палочка, обладающая многочисленными факторами

патогенности такими как: экзотоксины, липополисахариды, мукоидные полисахариды, жгутики, пили, экзоферменты и протеазы [58]. Среди основных микробных возбудителей нозокомиальных инфекций в России синегнойная палочка занимает второе место (17,6 %) по частоте встречаемости [57]. Из-за естественной резистентности к антибиотикам и способности образовывать биопленки, доступный выбор эффективных антисинегнойных антибиотиков сокращается по мере появления штаммов *P.aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью [13]. В связи с этим разработка эффективных терапевтических и профилактических препаратов для защиты от *P. aeruginosa* у пациентов с факторами риска, такими как сахарный диабет, муковисцидоз и ХОБЛ, имеет жизненно-важное значение.

Бактериальный жгутик *P. aeruginosa* состоит из базального тельца, крючка и нити [177]. Жгутиковая нить состоит из многочисленных копий белка флагеллина (далее – FliC), расположенных спирально [146]. Общая структура ядра филамента сохраняется у всех видов бактерий, тогда как внешние домены проявляют высокую вариабельность [116]. Помимо роли в передвижении, жгутик имеет значение в аспектах выживания, размножения и патогенности бактерий. Жгутики состоят из белка - флагеллина (от *flagellum* – жгутик). Флагеллины способны стимулировать иммунные реакции и активировать TLR5 фактор врожденного иммунитета [68].

Одним из наиболее перспективных направлений исследований является использование высокоиммуногенных доменов флагеллина в качестве белкового носителя и/или адъюванта в составе вакцин против широкого спектра возбудителей инфекционных заболеваний. Золотым стандартом для применения в качестве адъюванта в вакцинных препаратах используют флагеллин рода *Salmonella enterica* [46]. В РФ фазу доклинических исследований проходит вакцина против ротавирусной инфекции, активный компонент которой — химерный белок FliCVP6VP8, содержащий в своем составе фрагмент флагеллина *S. typhimurium*. Проведенные исследования продемонстрировали иммуногенность и безопасность этой кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции [28].

В НИИ гриппа (Санкт-Петербург) проводят доклинические исследования кандидатных вакцин против вирусов гриппа А различных подтипов [23]. Показано, что рекомбинантный белок, включающий ковалентно сшитые пептиды M2e вирусов гриппа на основе белковых носителей флагеллина и core-антигена вируса гепатита В, обладает иммуногенными свойствами. В ходе первой фазы доклинических исследований показано, что кандидатная вакцина на основе рекомбинантных белков снижала репродукцию вируса гриппа в легких иммунизированных мышей после заражения летальной дозой вируса [12].

В Шанхайском институте иммунологии L. Song с соавторами (2023) разработали кандидатную ДНК-вакцину против COVID-19, содержащую субъединицу S1 вируса SARS-CoV-2 и флагеллиновый адъювант (FliC Δ D2D3) из *Salmonella typhimurium*. Иммунизация мышей данной вакциной стимулировала формирование комплексного иммунного ответа, включающего синтез высокоаффинных нейтрализующих антител, а также активацию Т-лимфоцитов и стимуляцию врожденного иммунитета через Toll-подобные рецепторы (TLR4 и TLR5) [101].

Таким образом в научной литературе раскрыт опыт использования флагеллина выделенного из бактерий рода *Salmonella* в составе различных вакцин. Однако иммунобиологические свойства флагеллина *P. aeruginosa*, в отличие от детально изученного сальмонеллезного аналога, остается областью, требующей дальнейших исследований.

Цель и задачи исследования

Цель работы – получение рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa* и исследование его иммунобиологических свойств.

Задачи исследования:

1. Подобрать праймеры, клонировать нуклеотидные последовательности генов, кодирующих рекомбинантный белок FliC *P. aeruginosa* и создать штамм-продуцент рекомбинантного белка.

2. Разработать метод очистки рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* и синтезировать его в препаративном количестве.

3. Изучить иммунобиологические свойства рекомбинантного белка FliC (токсичность, протективность, антигенность и влияние на подвижность бактериальных клеток), получить иммунные сыворотки и оценить воздействие антител на биопленкообразование *P. aeruginosa*.

4. Исследовать адьювантные возможности рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* по отношению к неродственному антигену *K. pneumoniae*.

5. Получить моноклональные антитела к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa*, изучить их основные иммунохимические свойства и возможность использования в ИФА для детекции антигена.

Научная новизна

Впервые сконструирован штамм-продуцент *E. coli* pQE-30-FliC рекомбинантного белка флагеллина *P. aeruginosa* с использованием генно-инженерных технологий. Новизна подтверждена патентом Российской Федерации № 2793753 С1 от 05.04.2023.

Разработан оригинальный метод очистки рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa*, включающий последовательные этапы: получение телец включения, удаление примесей с использованием буферных растворов мочевины и гуанидин гидрохлорида, диализ, что обеспечивает получение не токсичного препарата со степенью чистоты 97,6 %.

Выявлены защитные свойства рекомбинантного белка FliC на модели экспериментальной синегнойной инфекции у мышей, продемонстрированы адьювантные возможности рекомбинантного белка FliC при сочетанном введении с поверхностным антигеном *K. pneumoniae*.

Установлено, что сыворотки полученные в результате иммунизации мышей рекомбинантным белком флагеллином подавляют зону роста и биопленкообразование *P. aeruginosa* штамма РА-103 в экспериментах *in vitro*.

Получены три гибридомы - продуцента моноклональных антител, взаимодействующие с одним участком молекулы рекомбинантного белка FliC и показана перспектива их использования в ИФА, для детекции антигена.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные о свойствах рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa* расширяют представления о функциональном потенциале исследуемого белка. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что данный белок не токсичен и обладает выраженными антигенными свойствами, а также тенденцией к проявлению адъювантных свойств, что делает его перспективным кандидатом для разработки вакцин.

Штамм *E. coli* pQE-30-FliC - продуцент рекомбинантного белка FliC депонирован в коллекцию штаммов ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова и может быть использован в качестве производственного в технологии получения рекомбинантного белка при разработке вакцины против синегнойной инфекции.

Разработана оригинальная методика получения высокоочищенного, не токсичного рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* обеспечивающая чистоту 97,6 %.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», г. Москва.

Все исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (протокол Учреждения № 7 от 29.09.2022).

Методология исследования спланирована в соответствии с поставленной целью. Объектом исследования стал рекомбинантный флагеллин *P. aeruginosa*, полученный в результате синтеза полноразмерной последовательности гена *fliC* с помощью ПЦР. Предметом исследования являлись иммунобиологические свойства полученного рекомбинантного белка и его адъювантные возможности. Анализ научной литературы, посвященной теме, проведен на основе формально-логистических методов исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов. В работе использованы микробиологические, молекулярно-биологические, иммунологические, биохимические, биологические и статистические методы. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволили обеспечить объективность полученных результатов и выводов.

Личный вклад автора

Научные результаты, содержащиеся в диссертации, получены автором лично и представляют собой законченное самостоятельное научное исследование. Автор принимал непосредственное участие во всех этапах работы, включая разработку дизайна исследования, научно-информационный поиск по теме диссертации, подготовку обзора литературы, определение цели и задач исследования, проведения экспериментов, статистическую обработку данных, на основании которых сформулированы основные положения работы, научно-практическая значимость исследования и выводы. Подготовка основных публикаций проведена при непосредственном участии автора.

Положения, выносимые на защиту

1. Сконструированный штамм-продуцент *E. coli* pQE-30-FliC характеризуется высоким выходом целевого продукта при культивировании, а разработанный оригинальный метод очистки рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* позволяет получать его со степенью чистоты 97,6 %. Новизна подтверждена патентом Российской Федерации № 2793753 С1 от 05.04.2023.

2. Рекомбинантный белок FliC не токсичен, обладает защитными свойствами с индексом эффективности 3,0, при иммунизации мышей стимулирует образование специфических антител, подавляющих зону роста и биопленкообразование *P. aeruginosa*. В сочетанном использовании с поверхностным антигеном *K. pneumoniae* проявляет адьювантные свойства с индексом эффективности 6,1.

3. Полученные моноклональные антитела к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa* относятся к классу IgG, направлены к одному участку на молекуле белка и позволяют выявлять данный белок при помощи ИФА.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология, областям исследования по п. 4. «Строение микробной клетки», п. 11. «Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ», п. 12. «Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности», п. 15. «Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждена проведением достаточного объёма исследований и выбором чётких, аргументированных критериев включения

материала в исследование. В работе использовались актуальные методики, выполненные на современном сертифицированном оборудовании.

Основные результаты доложены и обсуждены на научно-практических конференциях: "Биотехнология: наука и практика" с 20 по 24 сентября 2021 г. в санатории Ай-Петри (пгт. Кореиз, Алушкинское шоссе, 15, Крым); Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (Москва, 30–31 марта 2021 г.); X Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» 12-16 сентября 2022 г. в экоотеле «Алые Паруса» (к.п. Сатера, Алушта, Крым); Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (Москва, 03–04 июня 2022 г.); XI международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (п. Новомихайловский Краснодарский край, Туапсинский район 11-14 Сентября 2023 г.); Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (20–21 апреля 2023 г.) (награжден дипломом I степени на конкурсе молодых ученых); Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology», в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН. ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. (Москва, 2024г.) (награжден дипломом II степени на конкурсе молодых ученых); V - объединенного иммунологического форума (Пушкинские горы, 29 июня – 5 июля 2024 г.); XII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (п. Новомихайловский Краснодарский край, Туапсинский район 9-13 Сентября 2024 г.); Конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (22–23 апреля 2025 г.) (награжден дипломом I степени в секции «Микробиология»).

Апробация материалов диссертационного исследования проведена на конференции отдела микробиологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова (Протокол № 1 от 28.05.2025 г.).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебно-методическую и научно-исследовательскую деятельность кафедры фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». Акт внедрения № 1 от 21.03.2025.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 12 печатных работ, в том числе 2 научные статьи в журналах, входящих в международные базы данных Scopus, Web of Science, Chemical Abstracts, 1 – патент, 9 – публикаций в сборниках материалов международных всероссийских и межрегиональных научных конференций.

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации изложены на 128 страницах, иллюстрированы 6 таблицами и 21 рисунком. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 193 источника (их них – 66 отечественных и 127 зарубежных авторов).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Факторы вирулентности, антибиотикоустойчивость *P. aeruginosa* и профилактика синегнойной инфекции

Синегнойная палочка (лат. *Pseudomonas aeruginosa*) – условно-патогенная грамотрицательная аэробная неспорообразующая бактерия [64]. Данный микроорганизм подвижен и имеет форму прямых или изогнутых палочек длиной от 1 до 5 мкм диаметром от 0,5 до 1,0 мкм. Она широко распространена в окружающей среде, однако наибольшее значение для её циркуляции имеет вода. В водной среде при температуре 37 °С бактерия может выживать на протяжении года. Также «комфортной» средой обитания для неё являются некоторые медицинские растворы, такие как: дезинфектанты йодоформа йод-полоксамера, дезинфицирующие растворы фурацилина (которые предназначены для хранения катетеров и хирургического инструмента), растворы бензалконий-хлорида, хлоргексидина, глутаральдегида [20]. Синегнойная палочка может входить в состав нормальной микрофлоры организма, её обнаруживают на коже паха, области подмышек, носа, ушей, в глотке и желудочно-кишечном тракте.

В начале 70-х годов XX века *P. aeruginosa*, стала занимать лидирующие позиции как этиологический фактор инфекционных заболеваний, связанных с оказанием медицинской помощи. Патогенные свойства бактерии чаще проявляются в организме лиц с ослабленным иммунитетом (у детей и больных хроническими заболеваниями) [4].

P. aeruginosa относится к роду *Pseudomonas* и является представителем семейства *Pseudomonadaceae*. Род *Pseudomonas*, кроме синегнойной палочки, включает в себя еще более 20 видов, многие из которых также могут вызывать тяжёлые заболевания у человека [58, 62].

Синегнойная палочка нетребовательна к питательным средам и хорошо растет на искусственных средах. На мясопептонном бульоне дает рост в виде

помутнения с сероватой пленкой на поверхности. На плотных питательных средах формируются крупные полупрозрачные колонии флюоресцирующего зеленоватого цвета (Рисунок 1). При этом в толщу среды диффундируют синевато-зеленые водорастворимые пигменты – пиоцианин или флюоресцеин (Рисунок 2). Способность псевдомонад образовывать пигменты – наиболее характерный дифференциально-диагностический признак [137]. Синегнойная палочка при выращивании на питательных средах имеет кисловато-сладкий ароматный запах (специфический запах жасмина) [62].



Рисунок 1 – Колонии *P. aeruginosa* на чашке Петри



Рисунок 2 – Образование пигмента, окрашивающего питательную среду в синезеленый цвет

Синегнойная палочка имеет сложную антигенную структуру. В клеточной стенке локализован О-антиген [173]. Этот антиген (далее - Аг) представляет собой сложный макромолекулярный комплекс липополисахаридов. Типо- или группоспецифические Аг *P. aeruginosa* представлены липополисахаридами. Они являются основными структурными компонентами О-Аг, обуславливающими его специфичность. На основе структуры О-Аг проводят серологическое типирование [47].

Жгутиковый Н-антигенный комплекс *P. aeruginosa* представляет собой термолабильные белки с низкой специфичностью, обусловленной структурными различиями флагеллинов. В настоящее время идентифицировано 15 различных сероваров Н-антигена. Данный антиген детектируется исключительно у жизнеспособных, подвижных бактерий, не подвергавшихся воздействию дезинфицирующих или антимикробных агентов [47, 158].

Серологическое типирование культуры *P. aeruginosa* основано на определении комбинации группоспецифического О-Аг и типоспецифического Н-Аг, что позволяет установить принадлежность изолята к конкретной серологической группе (или Н-серовару) [47, 64].

Факторы вирулентности *P. aeruginosa*

P. aeruginosa обладает широким спектром факторов вирулентности, включающим в себя клеточные и внеклеточные компоненты, одним из ключевых элементов является жгутик. Он выполняет не только двигательную функцию, но и выступает ключевым фактором адгезии к абиотическим (медицинское оборудование) и биотическим (повреждённые ткани) поверхностям, что способствует диссеминации инфекционного начала. Подвижность, обеспечиваемая жгутиком, проявляется в способности бактерии к активному перемещению как в жидких средах, так и по твёрдой поверхности. Именно двигательная активность микроорганизма считается одним из ключевых факторов, запускающих процесс формирования биопленок, в результате которого появляются бактериальные сообщества с приобретенной устойчивостью к противомикробным препаратам [30, 113].

P. aeruginosa характеризуется наличием одного полярного жгутика, представляющего собой нить, образованную из полимеризованного флагеллина (FliC), типоспецифичного белка (FliD), крючка у основания нити (FlgE), двух белков соединения нити и крючка (FlgKL) и ряда базальных компонентов тела на внешней и внутренней мембранах [165]. В структуре белка FliC выделяют два консервативных домена (D0 и D1), формирующих N- и C-концевые области молекулы, и один гипервариабельный домен (D2/D3), расположенный в центральной части [172] (Рисунок 3).

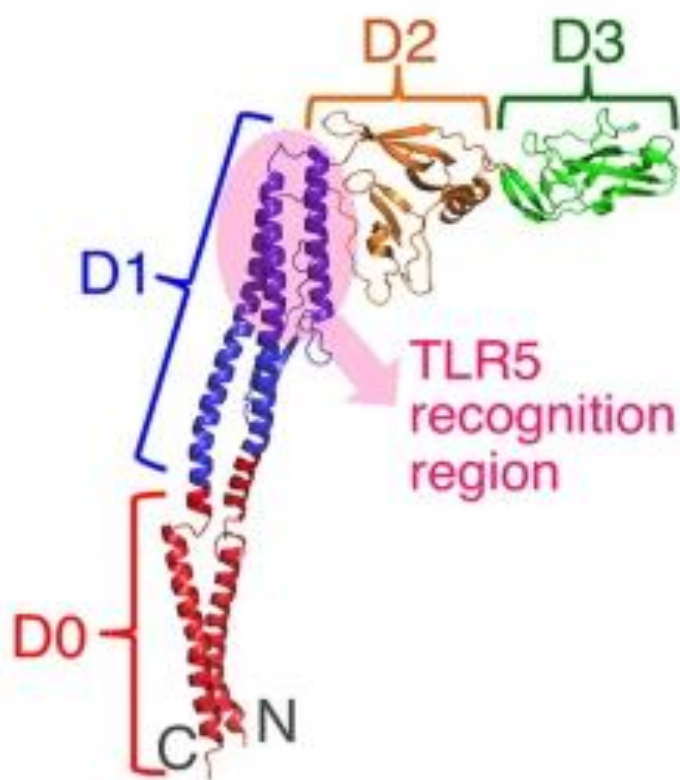


Рисунок 3 – Пространственная модель структуры белка FliC [129]

Подергивающая моторика включает движение придатков клеточной поверхности, называемых пиями. У *P. aeruginosa* специфическими пиями являются пили типа IV (Т4Р). Сборка пилей IV типа происходит внутриклеточно и требует участия ряда белков, включая PilA, PilC, PilB и PilQ. Данные белки обеспечивают быструю полимеризацию и деполимеризацию пилей, приводя к судорожным движениям [98]. Такие движения способствуют агрегации

бактериальных клеток с образованием мелких скоплений, которые впоследствии формируют сетчатую структуру, которая играет важную роль в миграции, адгезии и последующем формировании биопленки [13, 113]. Таким образом, органеллы бактерий, которые отвечают за подвижность являются факторами вирулентности и важны для нескольких функций, таких как обнаружение на поверхности и транслокация, изменение образа жизни и формирование биопленки. Подвижность и адгезия, играют важную роль в запуске иммунных реакций хозяина и развитии хронической инфекции [38, 73].

Мембранные белки *P. aeruginosa*

Внешняя мембрана *P. aeruginosa*, действует как селективный барьер, затрудняя проникновение антибиотиков. Она представляет собой асимметричный бислой, содержащий фосфолипиды и липополисахарид (далее – ЛПС). Порины, образующие β -цилиндрические белковые каналы, разбросаны внутри этой структуры. Сам ЛПС состоит из липида А, олигосахаридного ядра и О-антигена [181]. Примечательно, что органические соединения, такие как лимонная и молочная кислоты, действуют как хелатирующие агенты, разрушая олигосахаридное ядро путем связывания с катионами Mg^{2+} в молекуле ЛПС. Это взаимодействие изменяет проницаемость клеточной стенки бактерий, создавая дополнительный уровень устойчивости.

Внутри *P. aeruginosa* организовано разнообразное семейство поринов, которое способствует регулированию проницаемости мембраны. OprF служит основным неспецифическим порином, в то время как OprB, OprD, OprE, OprO и OprP являются специфическими поринами. OprC и OprH классифицируются как закрытые порины, а вытекающие порины включают OprM, OprN и OprJ [162].

Системы секреции белка *P. aeruginosa*

Системы секреции белков у бактериальных патогенов являются важным оружием вирулентности, позволяющим бактериям успешно инфицировать хозяина [135]. Они используются для высвобождения ферментов, которые гидролизуют сложные источники углерода в пригодные для использования соединения, или для высвобождения белков, которые захватывают важные ионы, такие как железо. Они

также используются для колонизации и выживания, вызывая острые или хронические инфекции, подавляя реакцию клеток-хозяев и ускользая от иммунной системы. Секретируемые белки могут оставаться связанными на поверхности бактериальной клетки, высвободиться во внеклеточную среду или вводиться в цитозоль клетки-хозяина [160]. На сегодняшний день у грамотрицательных бактерий описано шесть различных классов систем секреции, идентифицированных (от T1SS - T6SS) [175]. Секреция через T2SS и T5SS осуществляется в два этапа, включая остановку в периплазме [136], тогда как T1SS, T3SS, T4SS и T6SS используют одностадийный механизм, способствуя прямой доставке экзопротеинов во внеклеточную среду (T1SS) или в клетку-хозяина (T3SS, T4SS и T6SS) [160]. За исключением T4SS, все другие механизмы секреции, описанные у грамотрицательных бактерий, были обнаружены у *P. aeruginosa* [160]. Используя этот секреторный арсенал, *P. aeruginosa* способна продуцировать и высвобождать большое количество экзопротеинов, включая токсины и гидролитические ферменты.

Вторичные метаболиты *P. aeruginosa*

P. aeruginosa синтезирует ряд вторичных метаболитов, которые негативно влияют на прокариотические и эукариотические клетки, вызывая ингибирование роста или гибель [131]. Среди вторичных метаболитов наиболее важными являются феназины, алкилхинолоны, гомосеринлактоны и рамнолипиды [156]. Феназины, в частности пиоцианин, представляют собой гетероциклические соединения с окислительно-восстановительной активностью, обуславливающие зеленую флуоресценцию *P. aeruginosa*. Пиоцианин индуцирует окислительный стресс в клетках хозяина, генерируя активные формы кислорода [166]. Биосинтез пиоцианина контролируется двумя специфическими генами – *phzM* и *phzS*, отвечающими за финальные этапы превращения, а также гомологичными оперонами [113]. Опероны кодируют синтез феназин-1-карбоновой кислоты из ее предшественника, хорисминовой кислоты. Затем феназин-1-карбоновая кислота преобразуется в пиоцианин метилтрансферазой, кодируемой геном *phzM*, и флавинсодержащей монооксигеназой, кодируемой геном *phzS* [163].

Среди вторичных метаболитов, продуцируемых *P. aeruginosa*, присутствует цианистый водород (HCN) [72]. Его синтез активируется в условиях высокой плотности бактериальной популяции и низкого содержания кислорода. За образование HCN отвечает оперон *hcnABC*, кодирующий HCN-синтазу [113, 155]. Ионы CN⁻ являются неконкурентными ингибиторами, поскольку они могут связываться с Fe³⁺ в геме, который, в свою очередь, связывается с цитохром-с-оксидазой, предотвращая связывание кислорода. В следствии чего, клетка-хозяин неспособна осуществлять аэробное дыхание [78].

Экзотоксин А

Одним из основных внеклеточных факторов патогенности *P. aeruginosa* является экзотоксин А, представляющий собой термолабильный белок с молекулярной массой 66-72 кДа, включающий 613 аминокислотных остатков, которые формируют три функционально различных домена [18].

Механизм действия экзотоксина А реализуется через последовательное взаимодействие трёх доменов: первый из них связывается с $\alpha 2$ -макроглобулиновыми рецепторами клеток, второй обеспечивает проникновение через плазматическую мембрану, а третий подавляет синтез белка, блокируя наращивание пептидной цепи на рибосомах путём инактивации фактора элонгации EF2 (ADP-рибозилирование). Ключевую роль в активации токсина играет клеточная протеаза фурин, которая относится к семейству ферментов, осуществляющих ограниченный протеолиз белков-предшественников в эукариотических клетках [133]. Именно третий домен катализирует модификацию EF2, что приводит к ингибированию синтеза белка и запуску апоптоза [99]. Экзотоксин А обладает как местным, так и системным действием. *In vitro* он проявляет цитотоксическое действие, *in vivo* - некротизирующее. Введение экзотоксина А экспериментальным животным, в том числе приматам, приводит к развитию шока и гибели [31]. Токсигенные штаммы, выделенные у больных, более вирулентны, чем нетоксигенные. Больные, у которых до заболевания имелись антитела к экзотоксину А, реже умирали от псевдомонадного сепсиса [7]. Среди всех метаболитов *P. aeruginosa* экзотоксин А отличается наиболее высокой

летальностью в экспериментах на животных. Его воздействие сопровождается комплексом системных нарушений: общетоксическим синдромом, отеками, некрозами, гипертензией, переходящей в коллапс, метаболическим ацидозом, дыхательной недостаточностью и подавлением синтеза белка в клетках. Гистологически регистрируются некроз печеночной паренхимы, геморрагии в легких, тубулярный некроз почек и др [42].

Система определения кворума *P. aeruginosa*

Бактериальная коммуникация представляет собой совокупность регуляторных механизмов, обеспечивающих адаптацию физиологического состояния микроорганизмов в зависимости от плотности популяции и наличия других клеток. Основную роль в этом процессе играют низкомолекулярные сигнальные молекулы – аутоиндукторы [192]. Функционирование системы кворума (далее - КВ) напрямую зависит от численности клеток, при достижении определённого порога плотности популяции концентрация аутоиндуктора становится достаточной для связывания с соответствующим рецепторным белком, что запускает транскрипцию целевых генов [63]. У *P. aeruginosa* система КВ регулирует экспрессию генов отвечающих за вирулентность, адгезию и подвижность, а также контролирует биопленкообразование [35]. В геноме этого микроорганизма идентифицированы три системы КВ, это *las* и *rhl* (гомологи LuxIR), а также система PQS [41, 113].

Контроль экспрессии генов, ответственных за вирулентность, осуществляется посредством глобальной сигнальной сети, известной как кворум-сенсинг [182]. Функциональная суть данной системы заключается в реализации надклеточного принципа «все или ничего». Благодаря системе кворум-сенсинга все бактериальные популяции проявляют синхронный и однонаправленный ответ на внешние сигналы. Подавление данной системы рассматривается как перспективный подход для фармакологического контроля вирулентности *P. aeruginosa* [178]. Для этого предложен комплекс мероприятий, который получил название «кворум-квенчинг». Они включают в себя: деградацию или связывание сигнальных молекул с помощью ферментов, прерывание внутриклеточных

сигнальных каскадов, а также угнетение экспрессии генов, задействованных в глобальной регуляции [126, 161].

Биопленкообразование *P. aeruginosa*

Бактериальные биопленки представляют собой структурированные колониальные агрегаты клеток, чаще всего встроенные в матрикс из эндоплазматической сети (далее - ЭПС) [193]. Биопленки устойчивы к антибиотикам, фагоцитозу и поверхностно-активным веществам, что затрудняет их удаление [170]. Процесс формирования биопленки *P. aeruginosa* запускается при контакте с биотическими или абиотическими поверхностями, после чего начинается активная секреция компонентов внеклеточного матрикса, включая экзополисахариды и ДНК [25, 184]. В литературе выделяют пять последовательных этапов развития данного процесса [59]. Начальная стадия характеризуется обратимой адгезией, планктонные клетки прикрепляются к субстрату посредством жгутиков. Затем происходит непрерывное движение бактерий к зоне колонизации, где они формируют микроколонии; на этом этапе ключевую роль играют пили IV типа, обеспечивающие подергивающую подвижность. После завершения прикрепления у *P. aeruginosa* активируется экспрессия генов *algC*, *algD* и *algU*, контролирующей синтез альгинатных компонентов внеклеточного матрикса [79]. Третья стадия соответствует началу созревания биопленки: клетки активно пролиферируют, утрачивают подвижные структуры, при этом резко возрастает экспрессия ряда специфических генов. На четвертом этапе процессы созревания завершаются, и исходный монослой клеток трансформируется в трехмерную многоклеточную структуру. Заключительная, пятая стадия связана с дисперсией - выходом отдельных бактерий или их агрегатов из состава биопленки в окружающую среду, где они вновь переходят в планктонное состояние и способны инициировать формирование новых биопленок. Ключевыми факторами, обеспечивающими диспергирование и отделение бактериальных клеток от биопленки, являются плавающая способность *P. aeruginosa* и ферментативная деградация матрицы ЭПС [5, 113].

Формирование биопленок у *P. aeruginosa* регулируется сложной молекулярной сетью, в которую вовлечены КВ-системы *las* и *rhl*, двухкомпонентные регуляторные каскады, а также сигнальный нуклеотид *c-di-GMP* [14]. Система *las* необходима как на начальных этапах, так и на стадии созревания биопленки. Поскольку белок-регулятор LasR способен взаимодействовать с промотором оперона *psl*, есть основания полагать, что данная КВ-система участвует в контроле транскрипции *psl* [8]. Система *rhl*, в свою очередь, стимулирует продукцию полисахарида Pel, тем самым способствуя формированию структуры биопленки. В двухкомпонентной системе GacS/GacA регуляторный белок RsmA репрессирует экспрессию генов *pel* и *psl*. Взаимодействие между компонентами Gac и Ret (регулятором транскрипции экзополисахаридов) препятствует фосфорилированию Gac, вследствие чего ингибирующее действие RsmA снижается. Таким образом, Ret выступает в качестве негативного регулятора биопленкообразования [118]. Молекула *c-di-GMP* участвует в регуляции биосинтеза экзополисахаридов через связывание с белками PelD и AlgA-44, необходимыми для продукции полимеров Pel и альгината, соответственно. Повышенный уровень *c-di-GMP* способствует синтезу полисахаридов, тогда как снижение его концентрации, напротив, стимулирует подвижность за счет формирования жгутиков [84, 113].

Устойчивость к антибиотикам *P. aeruginosa*

Терапия инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, становится все более сложной задачей, что обусловлено особенностью данного микроорганизма к проявлению резистентности к широкому спектру антибактериальных препаратов [157]. В клинической практике для борьбы с инфекциями, вызванными *P. aeruginosa*, применяют различные классы антибиотиков: β -лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны и, в последнее время, полимиксины (например, колистин, полимиксин В) [55, 113].

Механизмы устойчивости *P. aeruginosa* к антибиотикам можно разделить на врожденные и приобретенные. Врожденные механизмы, такие как низкая проницаемость внешней мембраны, откачивающие насосы типа Mex и

цефалоспориноза AmpC, являются общими чертами данного патогена. Приобретенные механизмы могут быть адаптированы в результате мутаций хромосомных генов или горизонтального переноса [65]. Некоторые из механизмов приобретенной устойчивости в результате мутаций включают избыточную продукцию хромосомной AmpC-цефалоспориноказы, потерю специфичного к карбапенему OprD-порина и мутационную экспрессию откачивающих насосов. В случае горизонтально приобретенной устойчивости особую значимость вызывают β -лактамазы и карбапенемазы расширенного спектра действия. Металл- $lo\beta$ -лактамазы на сегодняшний день являются наиболее распространенными карбапенемазами у *P. aeruginosa* [102]. Устойчивость к карбапенемам может быть опосредована потерей экспрессии порина OprD, сверхэкспрессией откачивающих насосов и продукцией металло- β -лактамаз. Совместное действие этих механизмов устойчивости затрудняет лечение инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список бактерий устойчивых к антибиотикам; патогены в списке были ранжированы на основе нескольких факторов, таких как: смертность, резистентность, трансмиссивность и распространенность в медицинских учреждениях. В результате проведенных статистических исследований *P. aeruginosa* заняла второе место в данном списке после *Acinetobacter baumannii* [97]. Более того, поданным за 2019 год, *P. aeruginosa* заняла шестое место среди патогенов с наибольшим числом летальных случаев, связанных с устойчивостью бактерий к противомикробным препаратам [114].

Вакцины против синегнойной инфекции

Среди вакцин на территории РФ распространены такие вакцины как «Псевдовак» и вакцины серии «Минковак» для животных [34, 54].

«Псевдовак» — польская поливалентная вакцина для профилактики и терапии синегнойной инфекции, вакцина содержит антигены *P. aeruginosa* 7 иммунотипов [Вакцина Псевдовак: Электронный ресурс. - <http://pseudovac.ru/>] [54].

Работа над генно-инженерными вакцинами была начата еще в конце прошлого века. В 90-е годы были опубликованы научные работы о возможности использования антигенов *P. aeruginosa* в качестве компонентов вакцин [173].

В «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России сконструирована поливалентная корпускулярная вакцина против синегнойной инфекции, в состав которой входят цельные бактериальные клетки семи наиболее часто встречающихся серотипов *P. aeruginosa*, инактивированные эктерицидом [48]. В НИИВС им. И. И. Мечникова получена вакцина «Пиоиммуноген», представляющая собой водорастворимый антигенный комплекс, выделенный из слизи и клеточных стенок пяти штаммов возбудителя [24, 120]. Кроме того, сотрудниками данного института разработана ещё одна вакцина под названием «Псевдомонас», в основе которой лежит водно-солевой экстракт ацетон-обработанных (убитых) клеток четырёх штаммов *P. aeruginosa* [3]. В Харьковском и Уфимском филиалах НИИВС имени И.И. Мечникова совместно с НИИЭМ имени Н. Ф. Гамалеи были созданы вакцины содержащие атоксические формы экзотоксина-А *P. aeruginosa* [44].

В Московском НИИВС имени И.И. Мечникова были получены и исследованы слитые рекомбинантные белки OprF-OprI и OprF-aTox *P. aeruginosa* как прототипы вакцины и показаны их защитные свойства [32].

Несмотря на это, ни одна из описанных вакцин по ряду причин не нашла применения в клинической практике для иммунотерапии инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.

Новые подходы к созданию вакцин открывают множество возможностей в разработке эффективных препаратов для лечения и профилактики *P. aeruginosa*. Правильный подбор адъювантов также играет ключевую роль в повышении эффективности вакцинного препарата [189]. Адъюванты помогают усилить иммунный ответ и обеспечить пролонгированную защиту. Использование новых типов адъювантов, таких как бактадъюванты, предоставляет дополнительные преимущества, позволяя:

- Повысить безопасность вакцин;

- Участвовать в формировании более устойчивого иммунного ответа;
- Совершенствовать комбинированную иммунизацию против нескольких заболеваний [43].

Таким образом, сочетание инновационных технологий разработки вакцин и правильного выбора адъювантов создает новые горизонты для создания эффективных иммуно-препаратов, способных ответить на вызовы современности.

1.2. Бактериальные жгутики: их структура и функции

Жгутики бактерий представляют собой длинные тонкие нити, берущие начало от цитоплазматической мембраны. Толщина жгутиков 12-20 нм, длина 3-15 мкм. Жгутики встречаются у широкого спектра бактерий и играют решающую роль в выживании [139].

Открытие бактериальных жгутиков относится к концу XVII века, когда их впервые наблюдал под микроскопом Антони ван Левенгук. Однако только в 1950 годах структура и механизм движения жгутиков были полностью выяснены. С тех пор проведены обширные исследования, чтобы понять разнообразные функции и регуляцию бактериальных жгутиков [191].

Бактериальные жгутики (Рисунок 4) представляют собой сложные структуры, состоящие из трех основных частей: нити, крючка и базального тела [177].

Нить является наиболее видимой частью жгутика и состоит из повторяющихся субъединиц белка флагеллина. Эти субъединицы собираются в длинную спиральную структуру, которая образует основу жгутика. Жгутиковая нить может иметь длину несколько микрометров и различаться по диаметру в зависимости от вида бактерий. Спиральная форма нити позволяет ей генерировать крутящий момент при вращении базального тела, продвигая бактерию вперед [146].

Крючок представляет собой гибкую структуру, которая соединяет нить с базальным телом, обычно имеющим длину всего несколько сотен нанометров. Крючок позволяет нити менять направление при вращении и придает жгутику некоторую гибкость [142].

Базальное тело представляет собой сложный двигатель, который приводит в движение жгутики и состоит из нескольких компонентов, включая стержень, кольца и экспортный аппарат [174]. Кольца, встроенные в цитоплазматическую мембрану, обеспечивают структурную поддержку базального тельца и действуют как канал для экспорта жгутиковых компонентов. Экспортный аппарат отвечает за транспортировку субъединиц жгутика из цитоплазмы в жгутик [87].

В целом структура бактериальных жгутиков высококонсервативна у разных видов бактерий, но существуют различия в длине и диаметре нити, крючка, а также количестве и расположении колец в базальном теле. Считается, что эти вариации способствуют разнообразию функций жгутиков, наблюдаемых у разных видов бактерий [116].

Движение бактериальных жгутиков осуществляется за счет вращения базального тела; данный механизм создает крутящий момент, который передается через крючок на нить, заставляя ее вращаться и продвигать клетку вперед. Базальное тело бактериальных жгутиков состоит из нескольких колец, включая С-кольцо, MS-кольцо и Р-кольцо, которые встроены в цитоплазматическую мембрану, а также L-кольцо, которое распространяется через слой пептидогликана в периплазматическое пространство (Рисунок 4) [176]. С-кольцо отвечает за вращение жгутиков, используя энергию движущей силы протонов или ионов натрия для вращения ротора. Это вращение передается на MS-кольцо и Р-кольцо, которые неподвижны и служат для крепления двигателя к клеточной стенке. L-образное кольцо действует как статор, предотвращая вращение ротора относительно стенки ячейки [146]. Бактериальные жгутики могут вращаться как по часовой стрелке (CW), так и против часовой стрелки (CCW) [89]. Когда все жгутики бактерии вращаются в одном направлении, бактерия движется по прямой. Когда направление вращения меняется на противоположное, бактерия

меняет направление. Направление вращения жгутика контролируется молекулярным переключателем, расположенным в основании жгутика.

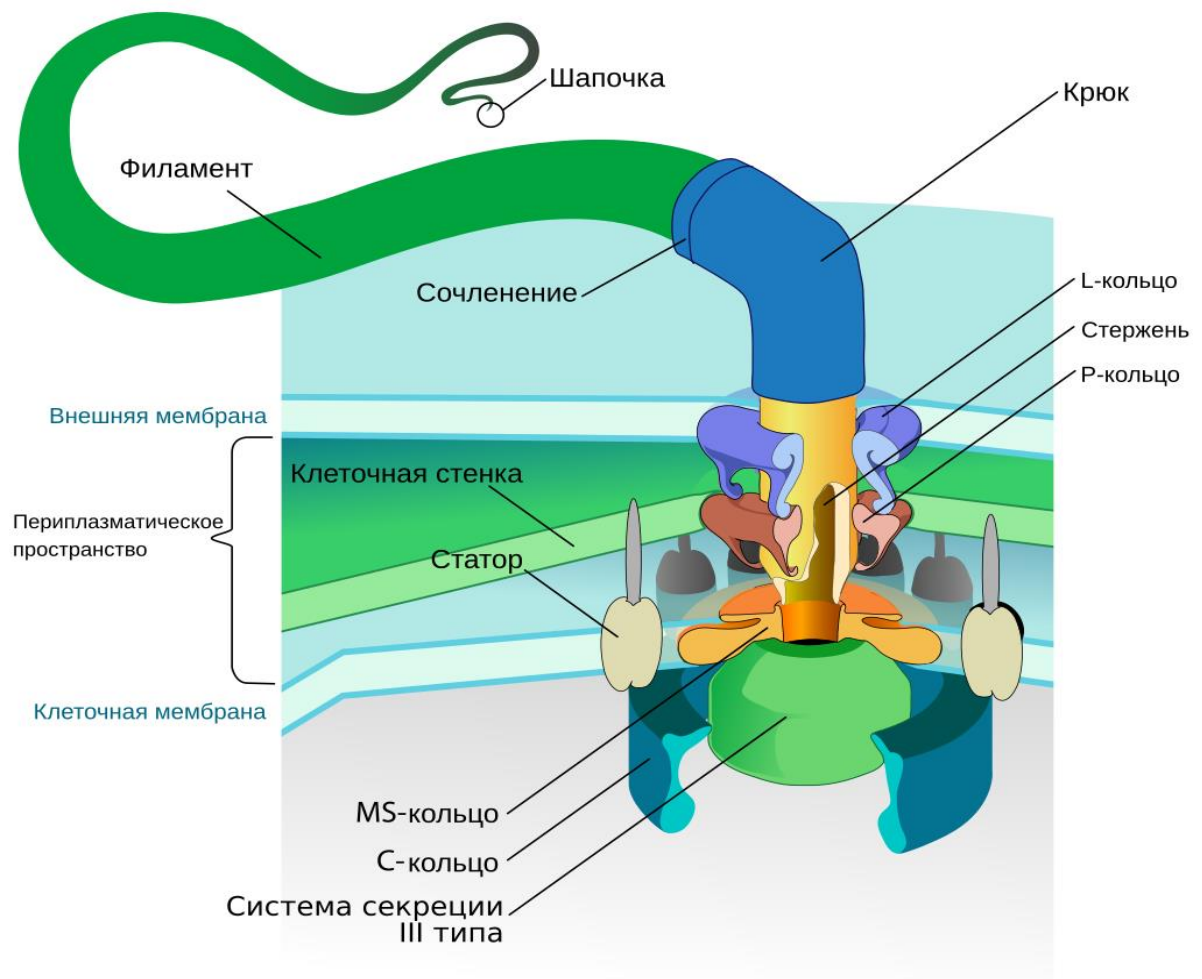


Рисунок 4 – Строение жгутика бактерии (https://ru.wikipedia.org/wiki/Жгутик#/media/Файл:Flagellum_base_diagram-ru.svg.)

Бактериальные жгутики также участвуют в хемотаксисе - направленном движении бактерий в ответ на химические градиенты [138]. Этот процесс включает связывание химических лигандов с рецепторными белками, расположенными на поверхности бактерий, что запускает каскад передачи сигнала, который в конечном итоге влияет на направление вращения жгутиков. Когда концентрация химического лиганда высока, бактерия движется к источнику, двигаясь по прямой, а когда концентрация низкая, бактерия меняет направление, чтобы исследовать новые области, ориентироваться в окружающей среде и реагировать на изменяющиеся условия [164].

Синтез и функция бактериальных жгутиков жестко регулируются как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях. Эта регуляция гарантирует, что жгутики производятся только тогда, когда они необходимы, и что они эффективно используются для подвижности и хемотаксиса [145].

Гены, участвующие в синтезе жгутиков, организованы в опероны, которые координировано регулируются различными факторами транскрипции (Рисунок 3) [86]. Одним из таких наиболее важных факторов является главный белок-регулятор FlhDC, который контролирует экспрессию ряда других регуляторов транскрипции и жгутиковых генов. FlhDC сам по себе регулируется различными сигналами, включая температуру, рН и доступность питательных веществ, что обеспечивает возможность для бактерий корректировать свой жгутиковый синтез в ответ на изменение условий окружающей среды [117].

Синтез жгутиков регулируется не только на уровне транскрипции, но и посттранскрипционной сетью РНК-связывающих белков и малых РНК [94]. Эти регуляторы могут влиять на стабильность, трансляцию и процессинг мРНК жгутиков, позволяя бактериям точно настраивать синтез жгутиков в ответ на определенные сигналы. Одним из наиболее важных посттранскрипционных регуляторов синтеза жгутиков является РНК-связывающий белок Hfq, который помогает стабилизировать и облегчить трансляцию жгутиковых мРНК [115].

На основании анализа литературных данных сформулирована роль бактериальных жгутиков:

1. Они обеспечивают бактериям перемещение по окружающей среде и поиск источников питательных веществ. Подвижность важна для выживания бактерий и колонизации новых сред и конкуренции с другими микроорганизмами [73].

2. Они участвуют в хемотаксисе - направленном движении бактерий в ответ на химические градиенты. Этот процесс имеет решающее значение для выживания бактерий в сложных средах [75].

3. Жгутики также могут играть важную роль в вирулентности бактерий, участвуя в диссеминации через ткани хозяина, избегая иммунной

защиты. Например, жгутик бактерии *Helicobacter pylori* может способствовать колонизации слизистой оболочки желудка и вызывать язву [26].

4. Они также могут участвовать в формировании бактериальных биопленок, которые представляют собой сообщества бактерий, прикрепляющихся к поверхностям и часто устойчивых к антибиотикам и иммунной защите. Жгутики некоторых бактерий, таких как *P. aeruginosa*, участвуют в первоначальном прикреплении бактерий к поверхностям и в последующем образовании биопленок [36].

5. Жгутиковые бактерии могут играть важную роль в круговороте питательных веществ, динамике пищевой цепи и передаче болезней [80].

В целом, бактериальные жгутики представляют собой структуры, которые играют важную роль в физиологии, экологии и эволюции бактерий. Изучение бактериальных жгутиков имеет решающее значение для понимания поведения и взаимодействия бактерий в их естественной среде обитания, а также для разработки новых стратегий борьбы с бактериальными инфекциями и экологическими изменениями.

1.3. Применение флагеллина в составе вакцинных препаратов

Бактериальный флагеллин является лигандом для множества типов клеток, участвующих во врожденном и адаптивном иммунном ответе [93]. Все большее число исследований демонстрирует эффективность флагеллина в качестве адьюванта, а также его способность связываться с TLR-5, который активирует противовоспалительный фактор транскрипции NF- κ B через адаптерный белок MyD88 (Рисунок 5). Ряд экспериментов показали, что использование флагеллина в качестве молекулярного адьюванта вызывает продукцию противовоспалительных цитокинов и запускает генерализованный рекрутинг Т- и В-лимфоцитов во вторичные лимфоидные участки, активирует CD11c-клетки и Т-лимфоциты способом, отличным от распознавания родственного антигена [6, 103].

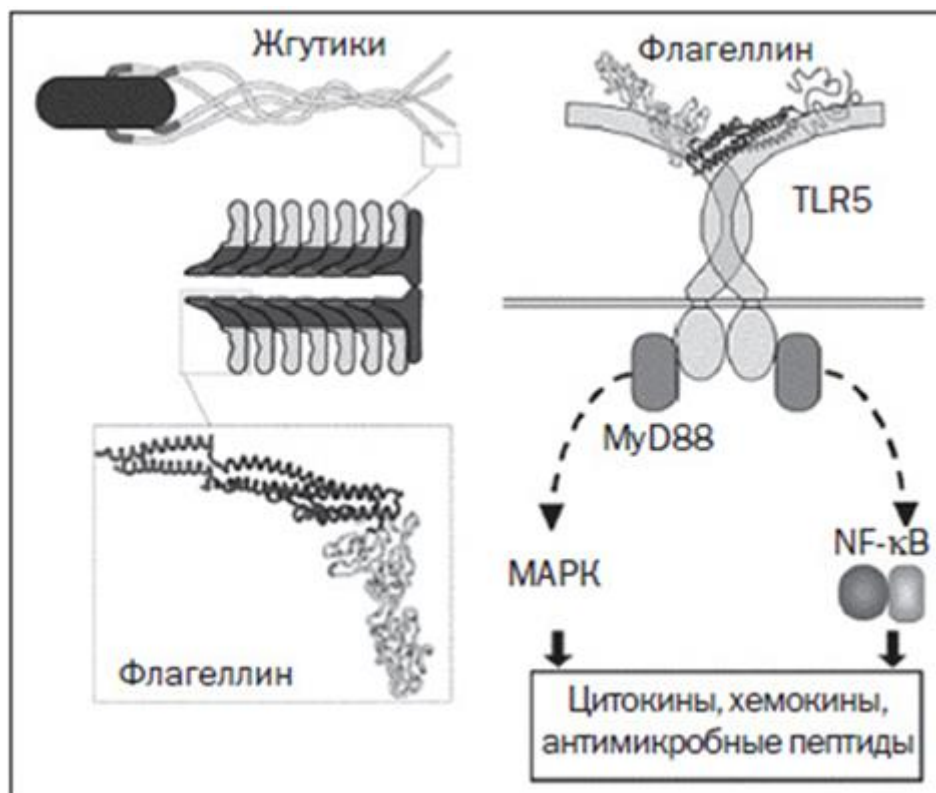


Рисунок 5 – Флагеллин - лиганд для рецептора врождённой иммунной системы TLR5 [1]

В работе Ciacci-Woolwine F. с соавторами было установлено, что флагеллин, являющийся основным структурным компонентом жгутиков грамотрицательных бактерий, выступает в роли эффективного индуктора продукции цитокинов в линии промоноцитарных клеток человека, проявляя максимальную активность уже в субнанолярных концентрациях [169]. В дальнейшем исследовании [143] установлено, что флагеллин быстро индуцирует активацию IL-1R-ассоциированной киназы 1, и это открытие позволило предположить, что рецептор флагеллина является членом семейства TLR. Несколько последующих исследований установили, что TLR5 является рецептором внеклеточного флагеллина [180]. Когда флагеллин присутствует внутриклеточно, например, во время заражения инфекцией, он сигнализирует через IPAF (также называемый NLRC4) [92] и Nair5. Консервативные С- и N-концевые домены флагеллина

необходимы для связывания с TLR5 [91], тогда как во взаимодействии флагеллина с Naip5, повидимому, участвуют 35 С-концевых аминокислот флагеллина [81].

Первые исследования, описывающие адьювантную активность флагеллина, были проведены Ben-Yedidia и Ruth Arnon с соавторами [83] и продемонстрировали, что гетерологичные пептидные последовательности могут быть встроены в молекулу флагеллина для создания вакцин, которые эффективно вызывают гуморальный иммунитет в отсутствие адьюванта. Особенность подобных вакцин состоит в том, что предшествующий иммунитет к флагеллину не ухудшал их способность вызывать устойчивый иммунный ответ. Этот вывод подтвержден Nonko с соавторами [108]. Вероятно, что данное свойство флагеллина обусловлено его высоким сродством к TLR5 и ограниченной занятостью рецептора, необходимой для достижения максимальной клеточной активации [141]. В течение последнего десятилетия проведено множество исследований, которые подтверждают адьювантные свойства флагеллина в контексте рекомбинантных вакцин [104, 108, 140].

Ввиду эффективности флагеллина как адьюванта, особенно в отношении слитых белков, значительные усилия были сосредоточены на механизмах, ответственных за его адьювантность. Исследования на мышах [144] показали, что доза флагеллина, необходимая для стимулирования максимального антиген-специфического гуморального иммунного ответа для защиты от летального респираторного заражения, была в 10 раз ниже, чем доза необходимая для индукции максимального врожденного ответа. Таким образом, сила гуморального ответа не связана линейно с силой врожденного ответа, а скорее требует лишь порогового уровня врожденного иммунитета для запуска гуморального ответа. Отсутствие простой линейной зависимости между величиной врожденных и адаптивных реакций, индуцированных флагеллином, связано с его способностью стимулировать ряд родственных процессов врожденного иммунитета, которые имеют решающее значение для развития гуморального ответа [88]. Данные процессы включают индукцию выработки провоспалительных цитокинов и хемокинов клетками лимфоидного и нелимфоидного происхождения, активацию

дендритных клеток и прямую стимуляцию Т-лимфоцитов [9, 56]. Индукция цитокинов и хемокинов является ключевым шагом в адьювантном эффекте флагеллина [106] и включает ряд типов клеток, чувствительных к флагеллину (например, дендритные клетки, эпителиальные клетки и стромальные клетки лимфатических узлов) [130]. Современные исследования показали, что микрососудистые эндотелиальные клетки экспрессируют TLR5 и реагируют на флагеллин [112]. Независимо от источника клеток, продуцирующих цитокины и хемокины, очевидно, что флагеллин может также способствовать заметному увеличению рекрутирования Т- и В-лимфоцитов в лимфатических узлах [167], что в свою очередь, повышает вероятность распознавания антигенов лимфоцитами.

В настоящее время принято считать, что основная часть адьювантов, прежде всего агонисты TLR, оказывают стимулирующее действие на дендритные клетки, индуцируя их созревание, активацию и последующую миграцию в лимфоидные органы [123, 150]. В литературе существуют значительные разногласия относительно влияния флагеллина на дендритные клетки и их предшественники. Некоторые исследования показали, что стимуляция флагеллином приводит к существенной активации мышинных дендритных клеток, происходящих из костного мозга, тогда как в других работах сообщено о влиянии на человеческие, но не на мышинные дендритные клетки [110, 150]. Так, было показано, что флагеллин оказывает значимое влияние на экспрессию CD80 и продукцию IL-6 [85].

Разнообразие результатов по оценке влияния флагеллина на дендритные клетки, является результатом совокупности биохимических и методологических факторов. Качество флагеллина является основной переменной, которая может существенно повлиять на результаты эксперимента. В нескольких исследованиях использовались коммерческие препараты флагеллина, для которых требуются концентрации, в 100 раз превышающие необходимые для генерации максимальной передачи сигналов через TLR5. Использование таких высоких концентраций неизбежно увеличивает уровень загрязняющих нуклеиновых кислот и эндотоксинов и может привести к TLR5-независимой активации дендритных клеток [70, 74]. Таким образом, очень важно использовать средства контроля

качества для определения относительного вклада TLR5-независимых и TLR5-зависимых механизмов препаратами флагеллина.

Растущее количество данных, полученных в ходе исследований *in vitro* на Т-клетках человека, продемонстрировало что флагеллин может напрямую стимулировать CD4 + и CD8 + Т-клетки. Caron и Crellin с соавторами [96, 119] обнаружили, что флагеллин эквивалентен анти-CD28 в стимуляции пролиферации CD4 + Т-клеток в сочетании с анти-CD3. Сообщалось также об усилении маркеров активации Т-клеток обогащенными CD4 + Т-клетками после стимуляции флагеллином.

что флагеллин способен непосредственно индуцировать пролиферацию неонатальных CD8+ Т-лимфоцитов человека, а также стимулировать продукцию цитокинов и гранзима В. Таким образом, флагеллин активирует Т-клетки по прямому механизму, не требующему распознавания специфического антигена. Что касается CD8 + Т-клеток, McCarron и Reen с соавторами [134] сообщили, что флагеллин может напрямую стимулировать неонатальные CD8 + Т-клетки человека, а также стимулировать продукцию цитокинов и гранзима В. Таким образом, флагеллин активирует Т-клетки по прямому механизму, не требующему распознавания специфического антигена (Аг). Однако степень, в которой прямая Аг-независимая активация Т-клеток способствует общему адьювантному эффекту флагеллина, еще предстоит определить [81, 96, 134].

Что касается возможного действия флагеллина на В-клетки, Pasare и Medzhitov с соавторами [154] сообщили, что прямое воздействие флагеллина на В – клетки является необходимым условием для активации данного типа клеток.

Стимулирующий эффект флагеллина на дендритные клетки и Т-клетки способствует резкому увеличению продукции антител. Гуморальный ответ характеризуется высокими титрами IgG1 и IgG2a, которые обеспечивают полную защиту от целевого патогена [109].

Флагеллин также имеет ряд других преимуществ, которые делают его привлекательным кандидатом для использования в вакцинах. Он эффективен в

очень низких дозах [1–10 мкг], что делает его перспективным компонентом для препаратов нового поколения [107].

Помимо того, что флагеллин является мощным иммуномодулирующим средством, он также обладает радиопротекторным свойством, которое защищает организм от ионизирующего излучения. Несколько исследований продемонстрировали радиопротекторный потенциал флагеллина. Системное введение флагеллина активирует рецепторы TLR5, что инициирует иммунный ответ через путь, опосредованный MyD88. Этот путь способствует активации различных иммунных клеток и продукции цитокинов, что может улучшать защитные механизмы организма при облучении [95]. Эта защита опосредуется клетками врожденной иммунной системы, которые выделяют цитопротекторные цитокины, такие как, известный радиопротектор гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ). Использование флагеллина в качестве радиопротекторного средства, зависит от времени введения флагеллина и дозы облучения. Положительный эффект наблюдается при введении флагеллина в течение 4 часов после облучения [53]. Полученные данные подтверждают, что своевременная стимуляция врождённого иммунитета играет ключевую роль в минимизации последствий радиационного воздействия. В работе Burdelya с соавторами была охарактеризована радиопротекторная способность агониста TLR5, CBLB502, и продемонстрировано, что введение этого препарата перед летальной лучевой нагрузкой защищала мышей и макак-резус как от желудочно-кишечного, так и от гематопоетического острого лучевого синдрома и увеличивала продолжительность жизни [76]. Это радиозащитное свойство зависит от активации сигнального пути NF-κB, который впоследствии достигает высшей точки в выработке антиапоптотических белков, поглотителей АФК и факторов роста. Эти факторы играют важную роль в защите CBLB205 от острых лучевых синдромов желудочно-кишечного тракта и кроветворения [81].

В настоящее время в мире существует один зарегистрированный флагеллиносодержащий препарат - CBLB502 / (Энтолимод) (Cleveland BioLabs, США), радиозащитная эффективность которого изучена на мышах и макаках-

резус. Энтолимо́д - рекомбинантный белок, кодируемый модифицированным вариантом гена флагеллина FliC серовара *Salmonella enterica*. Белок FliC является основным компонентом жгутиков сальмонелл и действует как агонист TLR5, он запускает активацию транскрипционного фактора NF- κ B, мобилизацию врожденного иммунного ответа, который управляет экспрессией многочисленных генов, включая ингибиторы апоптоза, поглотители активных форм кислорода и спектр защитных или регенеративных цитокинов [171].

Эффективность энтолимо́да в качестве противорадиационного средства была оценена на экспериментальных животных (мышях и макаках-резус). Эти исследования продемонстрировали, что однократное введение энтолимо́да до или после летальных доз облучения приводит к значительному увеличению их выживаемости. Было показано, что энтолимо́д уменьшает радиационное поражение органов, обеспечив защиту костного мозга и желудочно-кишечного тракта, а также улучшают регенерацию тканей [185].

Что касается потенциального использования флагеллина в вакцинах, предназначенных для человека, существует ряд областей, которые заслуживают дальнейшего изучения. Так, многие вакцины, обеспечивающие защиту населения молодого и среднего возраста, гораздо менее эффективны для пожилых людей, что в основном связано со снижением иммунитета и хроническими заболеваниями у пациентов старше 55-60 лет [22]. Флагеллин эффективен в качестве адъюванта в иммунной системе взрослых мышей, но не в такой степени, как у молодых [144]. Флагеллин также может усиливать действие других адъювантных систем. Включение флагеллина в вирусоподобные частицы приводит к увеличению продукции вирусспецифических IgG и клеточным ответам на антигены МНС классов I и II [122]. Аналогичное усиление ответа антител наблюдалось после пероральной иммунизации наночастицами, покрытыми флагеллином [168], или перорально вводимшегося бактериофага [105].

В настоящее время клинические испытания проходят несколько вакцин кандидатов на основе флагеллина - VAX102, VAX125 и VAX2012Q, разработанных американской биофармацевтической компанией VaxInnate Corporation. Согласно

данным I фазы клинических исследований, применение вакцин на основе рекомбинантных гибридных белков не сопровождалось побочными эффектами [132]. Экспериментальная вакцина VAX125, предназначенная для профилактики гриппа, успешно прошла доклинические исследования и I фазу клинических испытаний (Clinical Trials.gov NCT00730457) [3]. В исследовании с участием лиц пожилого возраста (средний возраст - 71 год) было продемонстрировано, что введение вакцины в дозе 5 мкг является безопасным и способствует более чем 10-кратному повышению титра антител, ингибирующих гемагглютинацию, а также обеспечивает практически полную серопротекцию (98 %) у лиц старше 65 лет [124]. Полученные данные позволяют рассматривать данную вакцину как перспективный кандидат для профилактики гриппа А как у молодых, так и у пожилых лиц.

1.4. Заключение по обзору литературы

Хотя ряд вакцин против инфекционных заболеваний на основе флагеллина уже прошли клинические испытания, многие фундаментальные научные вопросы и потенциальное использование флагеллина в качестве самостоятельного иммуногена или адъюванта еще предстоит изучить (например, в вакцинах, предназначенных для лечения синегнойной инфекции или для борьбы с опухолевыми клетками) [151]. Применение флагеллина для создания современных вакцин и иммунотерапии представляет собой многообещающий подход, который открывает новые возможности для исследований в области иммунологии и медицинской микробиологии. Доказанная способность флагеллина активировать ключевые компоненты иммунного ответа подчеркивают его потенциал как эффективного иммуногена, способного усиливать как гуморальные, так и клеточные иммунные реакции. Это особенно актуально в контексте растущей антибиотикорезистентности и появления новых инфекционных заболеваний, что требует разработки эффективных препаратов.

Важно отметить, что дальнейшие исследования должны охватывать не только механизмы действия флагеллина, но и его взаимодействие с другими компонентами вакцин, включая различные антигены и адъюванты. Кроме того, критически важным для разработки персонализированных подходов к вакцинации является понимание индивидуальных различий в реакциях на вакцинацию, обусловленных генетическими и иммунными факторами.

Помимо изучения эффективности, необходимо уделять пристальное внимание безопасности флагеллина. Активация иммунного ответа – это лишь часть задачи; крайне важно гарантировать, что такая активация не вызывает нежелательных эффектов, особенно у лиц с ослабленным иммунитетом. Разработка безопасных форм флагеллина и его комбинаций с другими адъювантами может значительно повысить эффективность и безопасность вакцин.

Направления будущих исследований также могут включать в себя создание платформ для изучения взаимодействия флагеллина с различными клеточными мишенями, что позволит освоить механизмы его воздействия на разные типы клеток иммунной системы. Эти знания будут существенно обогащать существующие теоретические базы и служить основой для практической реализации новых подходов.

Таким образом, флагеллин, благодаря своим иммуномодулирующим свойствам является важным объектом для научных исследований в перспективе разработки новых вакцин, методов лечения и профилактики различных инфекций.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

2.1.1. Используемые штаммы

В работе использовали следующие вирулентные штаммы для выделения геномной ДНК и оценки иммунобиологических свойств рекомбинантного флагеллина: *Pseudomonas aeruginosa* штамм PA-103 (ATCC29260) из коллекции лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, *Klebsiella pneumoniae* штамм № 204 из музея лаборатории протективных антигенов НИИВС им. И.И. Мечникова [номер в других коллекциях: GKPMGISK - 52 другие коллекции - № 50055; № 180103].

При клонировании генно-инженерных конструкций использовали следующие коммерческие штаммы: *Escherichia coli* M15 [pREP4] ($nal^S str^S rif^S lac^- ara^+ gal^+ mlt^- F-recA^+ uvr^+ lon^+[pREP4]$) (Qiagen, США), *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, США).

2.1.2. Используемые плазмиды

Для клонирования гена *fliC* *P. aeruginosa* использовали рекомбинантную плазмиду pTZ57R (Qiagen, США).

Для экспрессии гена *fliC* *P. aeruginosa* использовали рекомбинантную плазмиду pQE-30 (Fermentas, Литва).

2.1.3. Экспериментальные животные

Эксперименты проводили на прошедших карантин белых беспородных мышах одного пола массой 14-16 г и 18-20 г, а также мышах линии BALB/c массой

15-18 грамм. Животных получали из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России (филиал «Андреевка»). Животных содержали в идентичных условиях вивария (температура, относительная влажность, освещение и рацион питания) в соответствии с межгосударственным стандартом (ГОСТ 33217-2014). Протоколы экспериментов утверждены этическим комитетом ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, выписка протокола №7 заседания локального совета по этике от 9 сентября 2022 г. Животных выводили из экспериментов декапитацией под легким эфирным наркозом, с соблюдением принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы. Страсбург, 2004 г.).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Генно-инженерные технологии получения рекомбинантного флагеллина

Культивирование штамма *P. aeruginosa* и выделение геномной ДНК

Для восстановления *P. aeruginosa* из лиофилизированного состояния содержимое ампулы растворяли в 1 мл среды Мюллер-Хинтона (Amresco, США) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 4 часов, после чего пересекали на 1,5% скошенный агар Мюллер-Хинтона и инкубировали 18±2 часов при температуре 37 °С [11].

Культуру из пробирок пересекали на чашки Петри с агаризованной средой Мюллер-Хинтона и выращивали 18±2 ч при температуре 37 °С.

Осаждение биомассы проводили в центрифуге (Beckman Coulter Avanti J-E Centrifuge, США) при скорости вращения 6000 об/мин в течение 2 мин, затем растворяли осадок в дистиллированной воде с добавлением буферного раствора

Tris-HCl (Thermo Fisher Scientific, США) (pH 8,0) до концентрации 10 mM и 10% саркозила до финальной концентрации 0,5%.

ДНК из водной фазы выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [40].

Надосадочную жидкость отбирали в новые пробирки, после чего дезоксирибонуклеиновую кислоту (далее - ДНК) осаждали, добавляя 2,5 объема этанола и 1/10 объема ацетата натрия. Смесь выдерживали при температуре - 70 °С в течение 15-20 мин, затем центрифугировали 10 мин со скоростью вращения 13000 об/мин. Супернатант удаляли, а осадок дважды промывали 70 % этанолом, высушивали на воздухе и растворяли в дистиллированной воде. Далее в раствор вносили рибонуклеазу А (Thermo Fisher Scientific, США) до конечной концентрации 5-10 мкг/мл и инкубировали 30 мин при температуре 37 °С.

Секвенирование ДНК

Определение нуклеотидных последовательностей ДНК осуществляли по методу Сэнгера в научно-производственной компании «СИНТОЛ» [Электронный ресурс <https://www.syntol.ru/>].

Аmplификация гена *fliC* в ПЦР

Подбор праймеров для ПЦР осуществляли с использованием полноразмерной последовательности ДНК штамма *P. aeruginosa* PA-103 (база данных GenBank) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/647734823>] в программе «Omiga 2.0».

ПЦР проводили на приборе (Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler, США) по общепринятому протоколу.

Для приготовления 50 мкл реакционной смеси добавляли: 5 мкл 10 X буфера (0,67 M Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 0,15 M (NH₄)₂SO₄, pH 8,8), 5 мкл смеси дНТФ (10 mM), по 1 мкл каждого праймера (с концентрацией 12,5 пмоль/мкл), 1 мкл ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США) (3 ед./мкл), 1 мкл ДНК матрицы (Thermo Fisher Scientific, США) (1 пг/мкл). Объем доводили до 50 мкл сверхчистой водой.

Параметры амплификации: 95 °С в течение 3 минут (первичная денатурация); 35 циклов ПЦР: 94 °С - 30 секунд (денатурация), 65 °С — 30 секунд (отжиг праймеров с матрицей), 72 °С — 60 секунд (элонгация); 72 °С в течении 2 минут (заключительная элонгация).

При проведении оценочного электрофореза объем аликвоты соответствовал 10 мкл. При анализе амплификатов *fliC* использовали 1,5 % агарозный гель.

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот проводили в агарозных гелях с различной концентрацией 1, 1,5 и 2,0 % [27]. Для фракционирования ДНК по молекулярной массе проводили горизонтальный электрофорез в агарозном геле. Выбор концентрации агарозы зависел от типа анализируемых молекул: для разделения плазмидной ДНК использовали 1 % гель, для ПЦР-продуктов и фрагментов рестрикции - 1,5 % гель. Образцы смешивали с шестикратным буфером для нанесения (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03 % бромфеноловый синий; 0,03 % ксиленцианол FF; 60 % глицерин; 60 mM ЭДТА) в соотношении 6:1. В качестве маркера для определения молекулярной массы использовали GeneRule 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Напряжённость электрического поля при электрофорезе составляла 5 В/см. Визуализацию результатов осуществляли на трансиллюминаторе (Vilber Lourmat, Франция) в ультрафиолетовом диапазоне (254 - 310 нм). Размеры ампликонов определяли методом сравнения с маркерами молекулярной массы.

Рестрикция, выделение ДНК из агарозного геля и лигирование

Рестрикцию вектора проводили в ламинарном боксе в объеме 40 мкл, для этого использовали: по 1 мкл рестриктаз *BamH* I и *Hind* III (Fermentas, Литва), 4 мкл × 10 буфера для рестрикции R+ (10 mM Tris-HCl (pH 8,5 при температуре 37 °С), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, БСА (0,1 мг/мл), 4 мкг ДНК. Реакцию проводили в течение 1 часа при температуре 37 °С. Продукты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле.

Элюцию ДНК из агарозного геля выполняли с помощью набора «Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System» (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Для приготовления 20 мкл лигазной смеси использовали: 3 ед. T4 ДНК-лигазы (Fermentas, Литва), 2 мкл $\times 10$ буфера для лигирования 66 mM Tris-HCl (pH 7.6), 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT (дитиотреитол), 0,5 мкг ДНК (соотношение вектора и вставки составляло 1:10). Объем смеси доводили до 20 мкл сверхчистой водой. Реакцию лигирования проводили 12 часов при температуре 12 °С. Лигазную смесь хранили при температуре -20 °С.

Приготовление компетентных клеток и трансформация

Для получения компетентных клеток *E. coli* штамма M15 (Qiagen, США) культуру высевали на чашки Петри с 1,5 % агаризованной средой Luria Bertani (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Индия) (далее - LB), содержащей канамицин (25 мкг/мл). Изолированные колонии с характерной морфологией пересеивали в 3-4 мл жидкой среды LB с канамицином и инкубировали 12-14 ч в шейкере со скоростью вращения 180 об/мин при температуре 37 °С.

1 мл полученного инокулята вносили в колбу, содержащую 100 мл свежей среды LB, затем проводили культивирование при температуре 37 °С в течение 2 ч до достижения оптической плотности при 600 нм. Далее культуральную жидкость переносили в пробирки объемом 40 мл и выдерживали во льду 15 мин. Биомассу осаждали при температуре 4 °С в центрифуге (Beckman Coulter Avanti J-E, США) со скоростью вращения 3000 об/мин в течение 10 мин.

Осадок ресуспендировали в 12 мл раствора № 1 содержавшего (0,1 M RbCl, 0,07 M MnCl₂, 0,07 M CH₃COOK, 0,4 M CaCl₂, 10-13 % глицерин, pH 5,8), инкубировали во льду 15 мин и вновь центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок аккуратно ресуспендировали в 3 мл раствора № 2, который содержит (0,01 M RbCl, 0,08 M CaCl₂, 0,03 M MOPS, 10–13 % глицерин, pH 6,8) и инкубировали во льду ещё 15 мин. Суспензию компетентных клеток расфасовывали по 200 мкл в пробирки и замораживали при температуре -70 °С.

Трансформацию проводили, добавляя к 200 мкл клеточной суспензии 1-20 мкл лигазной смеси, после чего содержимое осторожно перемешивали и инкубировали на льду 30 мин. Затем пробирку помещали на 1,5 мин в водяную баню при 42 °С и сразу же возвращали в лёд. К образцу добавляли 800 мкл среды LB и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С на шейкере со скоростью 80 об/мин. Полученную культуру высевали на чашки Петри с LB-агаром, содержащим ампициллин (100 мкг/мл) и канамицин (50 мкг/мл), и инкубировали 12-14 ч при температуре 37 °С.

Выделение плазмидной ДНК в препаративных количествах

Петлей отбирали бактериальную культуру и вносили в 200 мл среды LB (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Индия), с добавлением антибиотиков канамицина и ампициллина (50 мкг/мл). Культуру выращивали в шейкере инкубаторе (Biosan, Латвия) со скоростью вращения 160 об/мин и температуре 37 °С, 10-12 ч. Центрифугированием осаждали бактериальные клетки при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре 4 °С. Осадок клеток ресуспендировали в буфере: 25 mM Tris, 10 mM ЭДТА, 50 mM глюкозы, pH 8,0; добавляли 40 мкл раствора лизоцима (10 мг/мл) и инкубировали 10 минут при температуре 4 °С. Затем растворяли в лизирующем буфере (0,2 M NaOH, 1% SDS), аккуратно перемешивали и добавляли 7,5 мл 3 M раствора CH₃COOK, и инкубировали 30 минут при температуре 4 °С. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием (Beckman Coulter Avanti J-E Centrifuge, США) при температуре 4 °С в течение 30 минут со скоростью вращения 10000 об/мин.

К полученному супернатанту добавляли 14 мл изопропанола, ресуспендировали и осаждали образовавшийся осадок центрифугированием со скоростью вращения 10000 об/мин в течение 20 мин при температуре 4 °С. Осадок растворяли в 700 мкл дистиллированной воды и переносили в микроцентрифужные пробирки.

К 700 мкл полученного раствора добавляли 400 мкл 7,5 M ацетата аммония, инкубировали 30 мин при температуре 20 °С, затем центрифугировали 10 мин со

скоростью вращения 16000 об/мин при температуре 4 °С. Из надосадочной жидкости ДНК осаждали изопропанолом (0,8 объёма).

Полученный осадок растворяли в 200 мкл дистиллированной воды, добавляли 200 мкл насыщенного раствора LiCl и выдерживали 2 ч при температуре -70 °С. Затем смесь центрифугировали 10 мин со скоростью вращения 16 000 об/мин при температуре 4 °С. Супернатант отбирали, а ДНК осаждали изопропанолом (0,8 объёма).

Высушенный осадок растворяли в 200 мкл воды высокой степени очистки, добавляли рибонуклеазу А до конечной концентрации 5-10 мкг/мл и инкубировали 20 мин при температуре 37 °С. После этого проводили фенол-хлороформную экстракцию и повторно осаждали ДНК изопропанолом (0,8 объёма).

Полученные препараты плазмидной ДНК растворяли в 100-400 мкл воды высокой степени очистки и хранили при температуре -20 °С [15]. Оценку полученных образцов проводили методом электрофореза в агарозном геле.

Экспрессия рекомбинантных конструкций в минипрепаративных количествах

Для получения рекомбинантного белка в минипрепаративных количествах проводили культивирование с индукцией экспрессии генов.

Петлей отбирали изолированную колонию из чашки Петри и штрихом высеивали на чашку со средой, содержащей антибиотики (канамицин, ампициллин) и выращивали культуру 12-14 ч при температуре 37 °С.

Для проведения культивирования делали мазок по полученному бактериальному штриху, который затем вносили в 5 мл среды LB с канамицином и ампициллином (50 мкг/мл).

Выращивали культуру в шейкере инкубаторе (Biosan, Латвия) в течение ночи (14 - 16 ч) при скорости вращения 170 об/мин и температуре 37 °С.

К 5 мл свежей LB среды с антибиотиками добавляли 250 мкл затравки и выращивали культуру в течение 1,5-2 ч при 170 оборотах в минуту и температуре 37 °С в термостатированном шейкере. Затем к 2 мл культуры добавляли 2 мкл изопропил-бета-D-тиогактопиранозид (далее – ИПТГ) (Neofroxx, Германия)

(конечная концентрация 1 mM). Оставшуюся культуру в объеме 3 мл использовали в качестве отрицательного контроля. Обе культуры выращивали в термостатированном шейкере 3,5-4 ч при скорости вращения 170 об/мин и температуре 37 °С. Затем отбирали аликвоты (1,5 мл) каждой культуры, переносили в микроцентрифужные пробирки и осаждали клетки центрифугированием при 10000 об/мин в течение 2 мин (MiniSpin plus).

Полученный осадок клеток ресуспендировали в буфере с мочевиной и анализировали с помощью электрофореза в 12 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Леммли.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) по Леммли

Для получения концентрирующего 12 % геля смешивали 7 мл раствора акриламида (40 % акриламида, 1 % N,N-бисакриламида), 9 мл буферного раствора для разделяющего геля (1,5 М Tris-HCl, 0,2 % SDS, pH 8,8) и 2 мл воды.

Концентрирующий гель готовили, смешивая 0,5 мл раствора акриламида (40 % акриламида, 1 % N,N-бисакриламида), 2,5 мл буферного раствора для концентрирующего геля (0,5 М Tris-HCl, 1 % SDS, pH 6,8) и 2 мл воды. Для полимеризации добавляли 250 мкл 10 % раствора персульфата аммония (далее – ПСА) и 2,5 мкл тетраметилэтилендиамин-N,N,N,N (далее – ТЕМЕД).

Электрофорез проводили в камере VE-1 (Helicon, Россия) при силе тока 30 мА (из расчета 15 мА на 1 стекло) с использованием трис-глицинового буфера следующего состава: 25 мМ Tris, 0,193 М глицин и 0,1 % SDS. Белки в геле окрашивали с помощью раствора Кумасси R250 (CDH, Индия).

Осадок бактериальной биомассы, полученной из 1 л культуральной жидкости, растворяли в литическом буфере (фосфатно-солевой буфер, 5 мМ ЭДТА, 7 мМβ-меркаптоэтанол pH 7,0). Суспензию подвергали ультразвуковой дезинтеграции с использованием гомогенизатора (Cole-Parmer 130-Watt Ultrasonic Processors, США) в режиме максимальной мощности – 130 Вт. Далее проводили трехкратное центрифугирование нерастворившейся фракции в режиме 10000 об/мин, 10 мин при температуре 4 °С. Полученные осадки ресуспендировали в соответствующих растворах, содержащих 10 мМ NaCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ CaCl₂,

40 мМ Tris-HCl, pH 8,0, добавляли 10 мг/л RNКазы А (Sigma, США) и 10 мг/мл ДНКазы I (Sigma, США) и инкубировали 15 мин при температуре 37 °С. Полученную суспензию центрифугировали со скоростью вращения 10000 об/мин при 4 °С 10 мин с последующим удалением супернатанта. Осадок ресуспендировали в 20 мл фосфатного буфера, содержащего 5 мМ EDTA, 20 % сахарозы и 1 % Triton X-100, инкубировали 10 минут при температуре 4 °С и центрифугировали со скоростью вращения 10000 об/мин в течение 30 минут при температуре 4 °С, собирали осадок содержащий тельца-включения.

Для дальнейшей очистки рекомбинантного белка FliC, содержащегося в тельцах включения, разработана оригинальная технология [45], основными этапами которой являются: 1) удаление примесей, растворимых в буфере, содержащем 8 М мочевины; 2) растворение рекомбинантного белка FliC в буфере, содержащем 6 М гуанидин хлорида; 3) перевод рекомбинантного белка FliC в нативные условия при помощи диализа. Для проведения очистки применяли следующие буферные растворы: 8 М мочевины, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 4 М мочевины, 0,1 М NaH₂PO₄, 0,01 М Tris-HCl, pH 8,0; 6 М гуанидин гидрохлорид, 0,1 М NaH₂PO₄, 0,01 М Tris-HCl, pH 8,0. В нативные условия рекомбинантный белок FliC переводили диализом (диаметр пор мембраны 12,5 кДа) против 50 мМ Tris-HCl, pH 9,0 с шестью сменами буфера и интервалами в 4 ч.

Определение степени чистоты полученной белковой фракции рекомбинантного белка FliC

Оценку чистоты полученной белковой фракции рекомбинантного белка FliC проводили при помощи обработки результатов электрофореза в ПААГ с использованием программного обеспечения Phoretix 1D (Total Lab, Великобритания).

Определение концентрации эндотоксинов

Определение концентрации эндотоксинов в препаратах проводили с использованием количественного хромогенного ЛАЛ-теста (Nucult Biotech, Нидерланды) по конечной точке согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации ОФС.1.2.4.0006.15.

Испытуемый образец в выбранном разведении смешивали с ЛАЛ-реактивом в 96-тилуночной планшете и инкубировали в термостате при температуре 37 °С от 10 до 20 минут, в зависимости от выбранного диапазона калибровочной кривой.

Затем добавляли раствор хромогенного субстрата и инкубировали смесь ещё в течение 6 минут.

После этого реакцию останавливали стоп-реагентом и проводили измерение оптической плотности реакционной смеси на спектрофотометре (Thermo Fisher Scientific Multiskan FC, США) при длине волны 405 нм.

Концентрацию эндотоксинов в испытуемом образце рассчитывали с помощью стандартной калибровочной кривой, построенной относительно стандарта эндотоксина.

2.2.2. Биологические методы анализа

Изучение острой (аномальной) токсичности рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa*

Белым беспородным мышам массой 18-20 гр внутрибрюшинно вводили препарат рекомбинантного белка FliC в дозах 25, 50, 100 мкг на мышь, используя 10 мышей в группе. Наблюдение за животными осуществляли в течение 7 дней. Ежедневно проверяли вес каждой особи, а также регистрировали состояние (поведенческие реакции, падеж) [60].

Определение протективной активности в опытах активной защиты мышей

Для иммунизации мышей массой 14-16 гр использовали различные препараты: рекомбинантный белок FliC в дозе 50 мкг/мышь; поверхностный антиген *K. pneumoniae* в дозе 50 мкг/мышь; смесь рекомбинантного белка FliC и поверхностного антигена *K. pneumoniae* в дозах по 50 мкг/мышь; рекомбинантный белок FliC сорбированный на гидроксиде алюминия Al(OH)₃ в соотношении 1:1 в

дозе 0,5 мл/мышь, которые вводили внутривентриально двукратно в объеме 0,5 мл на животное с интервалом 14 дней.

Заражение животных штаммами *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*

Заражение мышей проводили через две недели после курса иммунизаций. Колонии *P. aeruginosa* (штамм PA-103) и *K. pneumoniae* (штамм № 204) выращенные на агаре Мюллер-Хинтона (Amresco, США), смывали изотоническим раствором хлорида натрия и разводили до требуемой концентрации, используя отраслевой стандартный образец мутности (McFarland, США) (10 ед.).

Вирулентные культуры вводили мышам внутривентриально, используя по пять доз (с двукратным шагом) для каждой группы. Животным опытных групп вводили 12,5; 25; 50; 100 и 200 млн микробных клеток (м.к.) на одну мышь. Животным контрольных групп вводили 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 млн м.к. на одну мышь. В течение 7 сут после заражения проводили подсчет павших животных и рассчитывали ЛД₅₀ (доза, вызывающая гибель 50% экспериментальных животных). Оценку протективных и адьювантных свойств рекомбинантного FliC проводили, основываясь на показателе ЛД₅₀ и индексе эффективности (далее – ИЭ) (отношение ЛД₅₀ опытных и контрольных групп) в исследуемых группах.

Получение иммунных сывороток

Через 10 - 14 сут после иммунизации у мышей из каждой группы брали кровь и в сыворотке определяли титры специфических антител к рекомбинантному белку FliC с использованием иммуноферментного анализа (далее – ИФА).

Для этого у мышей вскрывали шейную вену и проводили тотальное кровопускание. Полученную кровь оставляли на полчаса в термостате при температуре 37 °С, после чего центрифугировали в течение 15 минут при скорости вращения 5000 оборотов в минуту на (Beckman Coulter Avanti J-E Centrifuge, США). Сыворотки переносили в 1,5 мл пробирки и хранили при температуре -20 °С.

Исследование иммунных сывороток на подавление зоны роста *P. aeruginosa* в полужидком агаре

Полученные сыворотки с различным разведением (1:100, 1:300, 1:1000 по отношению к среде), добавляли высокоточным дозирующим шприцом (Hamilton,

США) в агаризованную LB-среду (0,3 % полужидкий агар) и разливали в 12 луночные планшеты с радиусом лунки 22,6 мм и рабочим объемом 2,0 мл. Культуру *P. aeruginosa* штамма PA-103 разводили до оптической плотности (далее – ОП) 0,2 при OD600 и добавляли в центр каждой лунки планшета в объеме 0,2 мл. В качестве контроля использовали нормальную мышиную сыворотку (НМС). Далее проводили инкубацию в термостате при температуре 37 °С в течение 18 часов [15].

Изучение влияния поликлональных сывороток на биоплёнкообразование *P. aeruginosa*

Биопленкообразование изучали с помощью определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-луночного полистеролового стерильного планшета [38, 152].

Штамм PA-103 *P. aeruginosa* культивировали в 4 мл ГРМ-бульона, после чего содержимое переносили на чашку Петри с ГРМ-агаром и инкубировали в течение 14 часов при температуре 37 °С; образовавшиеся колонии смывали физиологическим раствором и разводили до оптической плотности среды 0,580 при длине волны 620 нм и засеивали в 96-луночный культуральный планшет фирмы (Nest, Китай). В лунки добавляли исследуемые сыворотки в разведениях от 1:512 000 до 1:4000 (1:512 000, 1:256 000, 1:128 000, 1:64 000, 1:32 000, 1:16 000, 1:8000, 1:4000) и инкубировали 24 часа при температуре 37 °С. Далее жидкую фракцию содержимого лунок удаляли с использованием вакуумного насоса, планшет промывали, внося в каждую лунку по 200 мкл физиологического раствора и выдерживая 5 минут. После этого биоплёнку окрашивали, добавляя в каждую лунку по 150 мкл 0,1%-ного спиртового раствора генцианвиолета. Планшет инкубировали при комнатной температуре 20 минут, лунки промывали для удаления излишка клеток и красителя, и переворачивали планшет вверх дном для просушки на 1 час. После тщательного трехкратного промывания дистиллированной водой в лунки для экстракции красителя из биопленки вносили по 200 мкл 96 % этилового спирта. Количественную оценку биоплёнок, сформировавшихся за 24 часа, проводили методом окрашивания кристалл -

виолетом. Оптическую плотность окрашенного раствора измеряли на спектрофотометре «Multiskan-Ascent» (Thermo-Labsystems, Финляндия) при длине волны 690 нм [15].

2.2.3. Иммунохимические методы изучения рекомбинантного флагеллина

Иммуноферментный анализ (ИФА) полученной фракции

Очищенный рекомбинантный белок FliC разводили в карбонатно-бикарбонатном буфере (далее – КББ) (NaH_2CO_3 - 3,37 г/л, Na_2CO_3 - 2,12 г/л, pH 9,4) до концентрации 5-10 мкг в мл. Полученный белковый препарат в объеме по 100 мкл вносили в лунки планшета (Costar, США). Сорбцию проводили в течение 14 часов при температуре 4 °С. После каждого последующего этапа планшеты трёхкратно отмывали от непрореагировавших компонентов раствором 0,15 М фосфатно-солевого буфера pH 7,2, содержащего 0,05% твин-20 (ФСБ-твин).

В лунки с сорбированным рекомбинантным белком FliC вносили анализируемые сыворотки, разведенные в фосфатно-солевом буфере (далее – ФСБ), содержащем 0,09 % казеин и 0,01 % Tween-20 в объеме 100 мкл. Планшеты инкубировали при температуре 37 °С в течение часа.

Затем в лунки вносили 100 мкл конъюгата антител кролика к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой хрена в разведении 1:5000 (ИМТЕК, Россия) в ФСБ-твин и также инкубировали в термостате в течение часа при температуре 37 °С. Реакцию проявляли однокомпонентным раствором 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (далее - ТМБ) (Amresco, США).

Через 10 минут реакцию останавливали 0,5 М раствором серной кислоты. Результаты реакции оценивали по оптической плотности на спектрофотометре (Thermo Fisher Scientific Multiskan FC, США) при длине волны 450 нм.

Получение поликлональных антител и иммунных спленоцитов

Для получения поликлональных антител (далее – ПкАт) мышей линии BALB/c иммунизировали трехкратно внутрибрюшинно рекомбинантным белком

FliC *P. aeruginosa* по 50 мкг в 0,5 мл физиологического раствора, pH 7,2, с двухнедельным интервалом. Через 7 дней после последней иммунизации рекомбинантным FliC у мышей проводили забор крови. Полученную сыворотку хранили при температуре -18 °С.

Для получения иммунных спленоцитов мышам трижды внутривентриально вводили препарат рекомбинантного FliC по 50 мкг в 0,5 мл физиологического раствора. За 3 дня до гибридизации проводили последнюю, бустерную инъекцию. Интервал между инъекциями составлял 2 недели. Эксперимент проводили на 10 мышах линии BALB/c массой 15-18 грамм. На 3-4 сутки после последней инъекции антигена у мышей, находящихся под эфирным наркозом, проводили тотальный забор крови. Селезёнку асептически извлекали, гомогенизировали в бессывороточной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Для удаления стромы суспензию спленоцитов фильтровали через стальное мелкоячеистое сито и отмывали дважды в среде без сыворотки, центрифугируя клеточные взвеси со скоростью вращения 1000 об/мин в течение 10 минут. После удаления надосадочной жидкости клетки ресуспендировали в 10 мл среды без сыворотки и подсчитывали их концентрацию в камере Горяева.

Приготовление фидерного слоя

В качестве фидерных (подкормочных) клеток в опыте использовали клетки перитонеального смыва мышей. Клетки получали путем промывания брюшной полости мышей линии BALB/c 5 мл бессывороточной среды. Суспензию клеток центрифугировали со скоростью вращения 1000 об/мин в течение 10 минут, надосадочную жидкость удаляли [21]. Клетки ресуспендировали в 5 мл питательной среды, подсчитывали и высевали на селективную среду с гипоксантином, аминоптерином и тимидином (далее - ГАТ) (ПанЭко, Россия) до концентрации 10^6 - 5×10^6 клеток на 96-луночный планшет. Процедуру проводили за сутки до гибридизации.

Получение гибридом, селекция, клонирование и культивирование

В качестве злокачественного партнёра для гибридизации использовали клетки несинтезирующей иммуноглобулины миеломы линии P3-X63-Ag8.653

(NP), дефектной по активности фермента ГГФРТ⁻, и, вследствие этого, не растущей на среде ГАТ. Перед гибридизацией миеломные клетки осаждали центрифугированием со скоростью вращения 1000 об/мин в течение 15 минут, отмывали в 20-30 мл бессывороточной среды, подсчитывали и смешивали с иммунными спленоцитами в соотношении 1:5 – 1:10.

Клеточную взвесь центрифугировали со скоростью вращения 1000 об/мин 10 минут, надосадочную жидкость удаляли. К смеси клеток добавляли по каплям 1 мл 50% раствора полиэтиленгликоля 1450 (Sigma, США) в течение 2 минут с последующим добавлением каждые 2 минуты 1, 2, 4 и 8 мл бессывороточной среды. Для равномерного слияния клеточную взвесь постоянно перемешивали путём вращения центрифужного стакана. Клетки отцентрифугированные при том же режиме ресуспендировали в среде ГАТ и вносили в лунки 96-луночных планшетов с фидерным слоем из расчёта $(1 - 5) \times 10^5$ клеток на лунку.

Миеломные и гибридные клетки культивировали в среде RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Селекцию гибридом проводили в течение 14 дней на среде с добавлением ГАТ и последующих 14 дней на переходной к обычной среде, содержащей гипоксантин и тимидин (далее - ГТ) (ПанЭко, Россия). Культивирование проводили в CO₂ инкубаторе (Sanyo, Япония) в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37 °С.

Контроль образования и роста (поли- или моноклональных) гибридных культур осуществляли визуально при помощи инвертированного микроскопа (Leitz, Германия). Тестирование культур на антителосекретирующую активность проводили на 7-10 сутки после слияния. Для этого из лунок с гибридными клетками, имеющими достаточный размер (не менее ¼ площади дна), отбирали часть культуральной среды [21]. Наличие специфических антител в среде культивирования гибридом определяли методом непрямого твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА), проводимого на 96-луночных планшетах фирмы (Costar Medium, США).

При первичном скрининге в 96-луночные планшеты (Costar, НВ), сенсibilизированные рекомбинантным белком FliC *P. aeruginosa* в концентрации 10 мкг/мл 0,05 М карбонатно-бикарбонатного буфера рН 9,6 в течение ночи при температуре 4 °С, вносили исследуемые образцы супернатантов культур в разведении 1:10 – 1:20. Здесь и далее все компоненты реакции вносили в объёме 100 мкл/лунку. После каждого этапа планшеты трёхкратно отмывали раствором 0,15 М фосфатно-солевого буфера рН 7,2, содержащего 0,05% твин-20 (ФСБ-твин). После инкубации планшетов с образцами исследуемых МкАт в течение часа при температуре 37 °С в лунки планшетов вносили пероксидазный конъюгат антител кролика к иммуноглобулинам мыши в рекомендуемом разведении 1:5000 (ИМТЕК, Россия) в ФСБ-твин и также инкубировали в термостате в течение часа при температуре 37 °С. Реакцию проявляли однокомпонентным раствором ТМБ (Amresco, США). Отрицательным контролем служила среда культивирования не синтезирующей иммуноглобулины линии клеток NP. В качестве положительного контроля использовали сыворотку крови взятой иммунизированной мыши. Через 10 минут реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0,5 М раствора серной кислоты. Результаты реакции оценивали по оптической плотности на спектрофотометре (Thermo Fisher Scientific Multiskan FC, США) при длине волны 450 нм.

Селекция

Культуры для последующей работы отбирали по значению оптической плотности, равной или превышающей 1,0 ед. Для определения активности антителопродукции отобранных данным образом культур, образцы супернатантов титровали двукратным шагом по горизонтальному ряду планшета, начиная с 1:10. За титр антител принимали предельное разведение образца, оптическая плотность которого в лунке планшета превышала значение ОП отрицательного контроля на 0,1 ед.

Для клонирования и последующих исследований отбирали наиболее активные (титр антител не ниже 1:640) и стабильные (сохранение антителопродукции на всём сроке культивирования) продуценты.

Клонирование

Клонирование гибридом, секретирующих антитела к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa*, проводили методом предельных разведений. Для этого клетки разводили обогащенной средой RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия) до концентрации 100-200 клеток на планшет и вносили в лунки 96-луночных планшетов, в которые предварительно, за 1-2 дня, были внесены перитонеальные макрофаги. Критерием успешного клонирования считали отсутствие роста гибридных клеток в 37% лунок [21].

Культивирование гибридных клеток *in vitro* и *in vivo*

Клоны, в среде культивирования которых выявляли моноклональные антитела (далее – МкАт) к рекомбинантному FliC в разведениях не менее чем 1:640, наращивали, постепенно переводя культуры на большие объёмы: из 96-луночных планшетов клетки переносили в 24-луночные планшеты, далее – в 6-луночные планшеты, и, по мере увеличения количества клеток, в чашки Петри (Ø 9 мм), используя в качестве (подкормочных) фидерные клетки. В течение всего процесса культивирования отбирали пробы для тестирования в ИФА с целью определения стабильности антителопродукции клонов.

Гибридные культуры, продуцирующие специфические антитела, подлежали криоконсервированию. Перед замораживанием клетки осаждали центрифугированием при скорости вращения 1000 об/мин в течение 10 минут и разводили средой, содержащей 20% сыворотки и 7% диметилсульфоксида (Serva, Германия) до концентрации 10^6 - 4×10^6 клеток в 1 мл. Клеточную суспензию поэтапно замораживали, затем пробирку с клетками хранили в контейнере с жидким азотом (-196 °C) [21].

Размораживание клеток проводили в воде с температурой 37-40 °C при постоянном встряхивании ампулы. Содержимое ампулы переносили в центрифужную пробирку с бессывороточной средой и центрифугировали со скоростью вращения 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в среде культивирования и вносили в культуральную посуду соответствующего количеству клеток объёма.

Для наработки антител заданной специфичности *in vivo* мышам линии BALB/c массой 14-16 г для стимуляции асцитического роста клеток внутрибрюшинно вводили пристан (Sigma, США) в объеме 0,5 мл на мышь. Через 10-14 дней животным вводили по 1-2 мл суспензии гибридных клеток в бессывороточной среде в дозе $(2-6) \times 10^6$ клеток на мышь. Формирование асцитов, как правило, происходило через 7-14 дней после прививки гибридом. У животных с достаточным размером экссудата проводили тотальный забор крови для получения сыворотки, также содержащей МкАт; асцитную жидкость брали стерильно с помощью шприца и отделяли от клеток центрифугированием со скоростью вращения 1000 об/мин в течение 10 минут. Асцитную жидкость разливали по аликвотам и хранили при температуре $-18\text{ }^\circ\text{C}$; клетки криоконсервировали.

Получение γ -глобулиновой фракции

Выделение МкАт из среды культивирования гибридных культур, асцитных жидкостей мышей, а также ПкАт из сыворотки крови мышей проводили общепринятым методом сульфатного осаждения. Для этого к содержащим антитела биологическим жидкостям при постоянном перемешивании добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония рН 7.0 (для более полного осаждения белков асцитной жидкости и сыворотки крови исходный препарат предварительно разводили в 2 раза физиологическим раствором). После 18 часов инкубации при температуре $4\text{ }^\circ\text{C}$ смесь центрифугировали со скоростью вращения 5000 об/мин в течение 45 минут. Супернатант удаляли, а осадок растворяли в 2 мл 0,15 М ФСБ рН 7,2, после чего проводили диализ против этого же буфера в течение 18 часов при температуре $4\text{ }^\circ\text{C}$ [38]. После определения концентрации белка на спектрофотометре (Genesys 10 uv, США) и титров антител в ИФА препараты γ -глобулиновой фракции разливали по аликвотам и хранили в морозильной камере при температуре $-18\text{ }^\circ\text{C}$.

Иммуноблоттинг

Перенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану 0,2 мкм (Bio-Rad, США) проводили влажным методом в камере (Helicon, Россия), с добавлением

буферного раствора 10 мМ бората натрия (рН 9,2) при 90 мА в течение 14-16 ч. После переноса мембрану окрашивали раствором Понсо-С в течение 1-3 мин и отмывали дистиллированной водой при постоянном перемешивании на протяжении 10 мин.

Неспецифические сайты связывания блокировали TSB-буфером (0,01 М Tris-HCl, 0,15 М NaCl, рН 7,4) с добавлением 3 % сухого обезжиренного молока (Bio-Rad, США) в течение 2 ч при температуре 20-25 °С. Затем мембрану нарезали на полосы, каждую из которых инкубировали с соответствующими моноклональными или поликлональными антителами, полученными из мышинной сыворотки. Антитела разводили в TSB-буфере, содержащем 1 % сухого обезжиренного молока и проводили инкубацию при постоянном перемешивании 2 ч при температуре 20-25 °С.

После инкубации полосы трижды отмывали в TSB-буфере с 0,5 % содержанием обезжиренного молока и 0,5 % Tween-20, меняя раствор каждые 5 мин при интенсивном встряхивании. Затем образцы инкубировали с конъюгатом, меченным пероксидазой хрена, в TBS-буфере с 1 % обезжиренного молока в течение 1 ч при температуре 20-25 °С. После повторной отмывки (описанной выше) специфическое связывание осуществляли с помощью хромогенного субстрата - раствора диаминобензидина (0,1 г диаминобензидина, 30 мкл 30 % пероксида водорода, 50 мкл 1 мМ имидазола в 10 мл 50 мМ Tris-HCl, рН 7,5). Результат взаимодействия антител с рекомбинантным белком флагеллином оценивали по специфическому появлению окрашенных полос на мембране.

Конъюгирование МкАт с пероксидазой хрена

Конъюгирование МкАт с пероксидазой хрена проводили периодатным методом по Накане [147].

Для активации изофермента С 2 мг пероксидазы из корня хрена растворяли в 0,5 мл дистиллированной воды, добавляли 0,1 мл свежеприготовленного 0,2 М раствора NaIO₄ и перемешивали в течение 20 минут в темноте при комнатной температуре. Затем полученный раствор диализовали против 1 мМ Na-ацетатного буфера, рН 4,5 в течение ночи при 4 °С. Далее рН полученного раствора доводили

до 9,0 - 9,5 с помощью 0,2 М карбонат-бикарбонатного буфера, pH 9,5, и добавляли 4 мг МкАт в 0,5 мл того же буфера. Реакционную смесь инкубировали при перемешивании 2 часа при комнатной температуре и вносили 0,05 мл свежеприготовленного раствора NaBH_4 с концентрацией 4 мг/мл. После 2 часов инкубации при температуре 4 °С и периодическом перемешивании полученный конъюгат диализовали против 1000-2000 объёмов 0,01 М ФСБ, pH 7,2 в течение ночи при температуре 4 °С.

Стабилизацию полученных препаратов конъюгированных антител осуществляли путём добавления 5% БСА и равного объёма 87 % глицерина. Конъюгаты хранили при температуре -18 °С.

Конкурентный - вариант ИФА

Эпитопную направленность МкАт изучали методом конкурентного ИФА. На первом этапе подбирали концентрации антигена и антител в пределах от 0,5 до 10 мкг/мл. Концентрация антигена должна быть минимальной необходимой для перекрывания специфических эпитопов для связывания с антителами.

Для постановки конкурентного анализа в лунки планшета (Costar, НВ) одновременно вносили по 100 мкл МкАт и МкАт-ПХ (МкАт, конъюгированные пероксидазой хрена) разных клонов, в концентрации соответствующей 50 % связыванию антител с антигеном, иммобилизованном на планшете. В качестве контроля использовали лунки с МкАт и МкАт-ПХ одного клона. Реакцию проявляли добавлением 100 мкл однокомпонентного раствора ТМБ (Amresco, США).

Через 10 минут реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0,5 М раствора серной кислоты. Результаты реакции оценивали по оптической плотности на спектрофотометре (Thermo Fisher Scientific Multiskan FC, США) при длине волны 450 нм.

Сэндвич - вариант ИФА

Данный вид иммуноферментного анализа проводили в нескольких вариантах, используя в качестве покрывающих поверхность планшетов ПкАт-(FliC) и МкАт-2(FliC) в концентрациях 5,0 мкг/мл и в объёме 100 мкл/лунку.

Планшет выдерживали в течение ночи при температуре 4 °С и отмывали. Далее в лунки планшета вносили двукратные, начиная с 5 мкг/мл, разведения рекомбинантного белка FliC в объеме 100 мкл/лунку.

После инкубации в течение часа при температуре 37 °С и последующей отмывки в лунки планшетов вносили конъюгат МкАт-2-ПХ в рабочем разведении 1:1000. Проявляли реакцию однокомпонентным раствором ТМБ. Через 10 мин реакцию останавливали добавлением 0,05 мл/лунку 0,5 М раствора серной кислоты. Результаты реакции учитывали на спектрофотометре (Thermo Fisher Scientific Multiskan FC, США) при длине волны 450 нм. Значения ОП для отрицательного контроля (лунки без добавления рекомбинантного белка FliC) составляли $\leq 0,1$.

2.2.4. Статистические методы

Статистический анализ данных осуществляли в программе Microsoft Office Excel. Микробиологические эксперименты по оценке количественных показателей проводили не менее трех раз.

ЛД₅₀ вычисляли по формуле Кербера в модификации согласно руководству И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [2]:

$$\lg \text{ЛД}_{50} = \lg A - \lg 2 \times (B_1/C_1 + B_2/C_2 + B_3/C_3 + B_4/C_4 + B_5/C_5 - 0,5),$$

где А – максимальная инфекционная доза в опыте; В – количество животных, павших в группе; С – общее количество животных в группе; число в нижнем индексе означает номер заражающей дозы. Определение доверительных интервалов ЛД₅₀ при $p=0,95$ проводили согласно руководству И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [2].

Индекс эффективности защитных свойств определяли как отношение значения ЛД₅₀ в опытной группе (группа иммунизированных инфицированных мышей) к значению ЛД₅₀ контрольной группы (группа неиммунизированных инфицированных мышей).

Для сравнения выраженности показателей в двух несвязных выборках использовали непараметрический статистический критерий Манна-Уитни. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

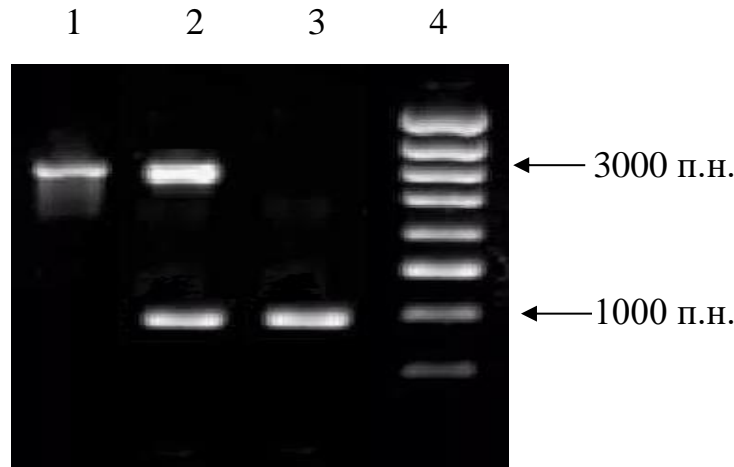
3.1. Клонирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих рекомбинантный белок флагеллин *P. aeruginosa*

На основании анализа литературных данных, для исследования представлял интерес консервативный белок флагеллин (FliC) *P. aeruginosa*, являющийся структурным компонентом жгутика бактерии.

На первом этапе проведен анализ нуклеотидной последовательности гена *fliC*, с использованием имеющихся в открытом доступе данных геномных библиотек. Из штамма PA-103 *P. aeruginosa*, методом фенол-хлороформной экстракции получен образец геномной ДНК. При помощи биоинформационного анализа в программе «Omiga 2.0» подобраны праймеры с целью амплификации гена *fliC*, кодирующего синтез полноразмерного белка флагеллина: прямой праймер соответствовал последовательности гена *fliC* (5'-GGA TCC GCC TTG ACC GTC AAC ACC AAC ATC G) и имел дополнительный сайт рестрикции *Bam*HI, а обратный праймер был комплементарен последовательности (5'-AAG CTT AGC GCA GCA GGC TCA GAA CCG AC).

Методом ПЦР провели амплификацию фрагмента генома *P. aeruginosa*, кодирующего полноразмерный белок флагеллин. В результате получены специфичные продукты размером 1005 п.н., соответствующие нуклеотидной последовательности фрагмента генома *P. aeruginosa*, кодирующего полноразмерный белок флагеллин. Концентрация ДНК в реакционной смеси после ПЦР варьировала от 50 до 100 нг/мкл.

На следующем этапе ПЦР-продукт клонировали в неэкспрессирующий вектор pTZ57R (Рисунок 6, дорожка 1). Далее провели лигирование и трансформацию в клетках *Escherichia coli* DH5 α . Затем получили колонии на плотной питательной среде, которые пересеивали на жидкую LB-среду. В результате из выросшей бактериальной культуры выделили плазмидную ДНК.



Примечание: Дорожки: 1 – плазмидный вектор pTZ57R; 2 – генно-инженерная конструкция для получения рекомбинантного белка FliC в клетках *E. coli* штамма M15 (pTZ57R-FliC); 3 – результат ПЦР амплификации гена *fliC*; 4 – ДНК-маркер с указанными размерами п.н.

Рисунок 6 – Результаты ПЦР-амплификации последовательности нуклеотидов, кодирующих белок FliC и рестрикционный анализ генно-инженерной конструкции pTZ57R-FliC в 1 % агарозном геле

Для скрининга клонов и проведения рестрикционного анализа проводили электрофоретическое разделение в 1-1,5 % агарозном геле. Ген *fliC* гидролизовали рестрикционными эндонуклеазами *Bam*HI и *Hind*III, которые расщепляют ДНК в строго определённых участках, образуя липкие концы, необходимые для последующего встраивания гена в вектор (Рисунок 6, дорожка 2).

Подтверждение нуклеотидной последовательности кодирующей рекомбинантный белок FliC в вектор pTZ57R проводили секвенированием по методу Сэнгера (Рисунок 7).

```

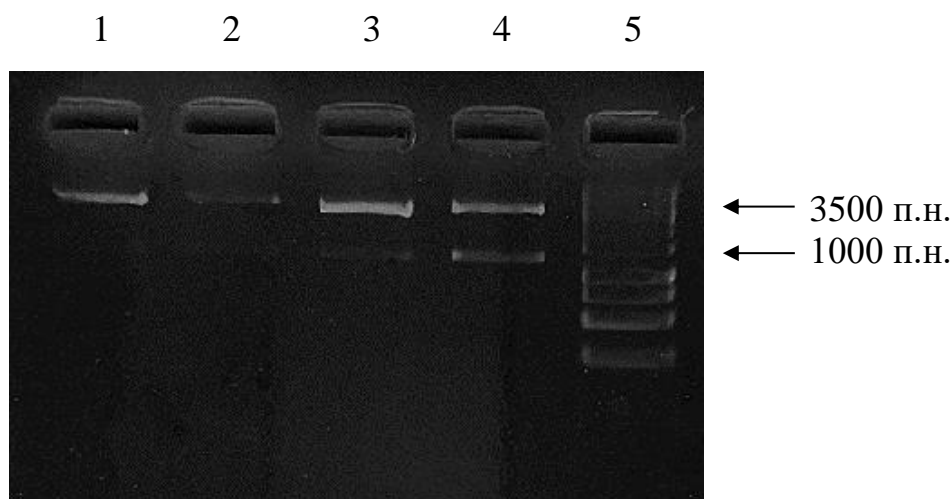
GTCTTGACCGTCAACACCAACATCGCTTCGCTGAACACTCAGCGGAACCT
GAACAACCTCTTCCGCGTCGCTGAACACTTCGCTGCAGCGTCTGTCCACCG
GTTCGCGCATCAACAGCGCCAAGGACGACGCCGCCGGCCTGCAGATCGC
CAACCGTCTGACCAGCCAGGTCAACGGCCTGAACGTGGCTACCAAGAAC
GCCAACGATGGTATCTCCCTGGCGCAGACCGCTGAAGGCGCCCTGCAGCA
GTCGACCAACATCCTGCAGCGTATGCGTGACCTGTCCCTGCAGTCGGCCA
ACGGCTCCAACAGCGACTCCGAGCGTACCGCTCTGAATGGCGAAGTGAA
GCAACTGCAGAAAGAACTGGATCGTATCAGCAACACCACCACCTTCGGTG
GCCGCAAGCTGCTCGACGGTTCCTTCGGCGTCGCCAGCTTCCAGGTGGGT
TCGGCCGCCAACGAAATCATCAGCGTCGGCATCGACGAGATGAGCGCAG
AGTCGCTGAACGGCACCTACTTCACGGCTACTGGCGGGCGGTGCGGTCACT
GCTGCAACCGCTTCGGGCACCGTCGACATCGCGATCGGCATCACTGGCGG
CAGCGCCGTGAACGTCAAGGTTCGACATGAAGGGCAACGAAACCGCCGGG
CAGGCGGCTGCCAAGATCGCCGCTGCGGTCAACGACGCCAACGTCGGCA
TCGGTGCCTTCACCGACGGCGCGCAGATCAGCTACGTGTCCAAGGCTAGT
GCGGATGGTACTACAGTTCGGTTCGGCGTAGCCATCACCGACACCGG
CAGCACCGGCGCAGGCACCGCGGCAGGCACCACGACGTTACCGAGGCT
AACGACACCGTCGCCAAGATCGACATCTCCACCGCGAAGGGCGCTCAGTC
CGCCGTGCTGGTGATCGACGAGGCGATCAAGCAGATCGACGCCCAGCGT
GCCGACCTCGGTGCGGTGCAGAACCGCTTCGACAACACCATCAACAACCT
GAAGAACATCGGTGAGAACGTATCGGCTGCTCGCGGCCGGATCGAAGAC
ACCGACTTCGCAGCCGAAACCGCCAACCTGACCAAGAACCAAGTGCTGC
AACAAGCCGGCACCGCGATCCTGGCCCAGGCCAACAGCTGCCGCAGTC
GGTTCTGAGCCTGCTGCGCTAA

```

Рисунок 7 – Клонированная последовательность гена *fliC* исключая первый триплет - метионин

На следующем этапе, ген *fliC* вырезали из неэксперессирующего вектора pTZ57R-FliC по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III, а затем по тем же сайтам рестрикции встраивали в плазмидный вектор pQE-30.

Далее проводили трансформацию плазмиды в клетках *E. coli* штамма M15, полученные колонии подращивали на плотной питательной среде с переносом на жидкую LB-среду. Затем проводили выделение плазмидной ДНК. Отбор клонов осуществляли при помощи рестрикционного анализа в 1-1,5 % агарозном геле (Рисунок 8).

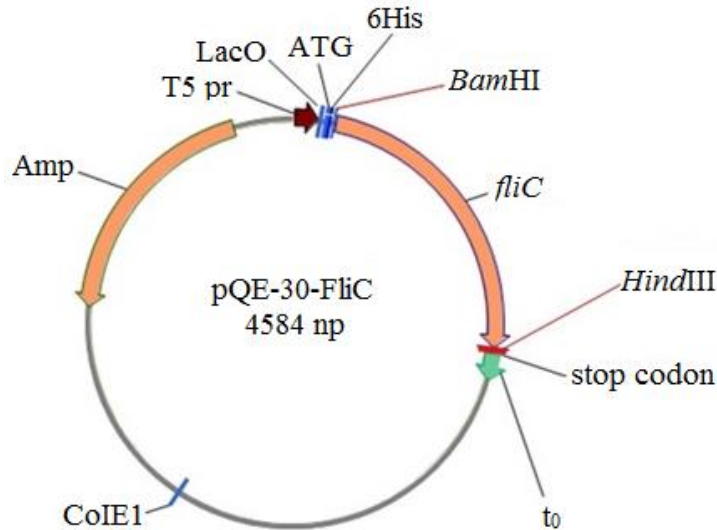


Примечание: Дорожки: 1 – контрольная плазмидная ДНК pQE-30; 2 – клон № 2; 3 – клон № 18; 4 – клон № 20; 5 – ДНК-маркер с указанными размерами п.н.

Рисунок 8 – Рестрикционный анализ генно-инженерной конструкции pQE-30 - FliC в 1 % агарозном геле

В процессе работы по результатам рестрикционного анализа в 1 % агарозном геле был отобран клон № 20 (Рисунок 8, дорожка 4), первый фрагмент которого соответствовал размеру контрольной плазмидной ДНК (3500 п.н.), а второй - ПЦР продукту с размером 1161 н.п.

В результате получена рекомбинантная конструкция pQE-30-FliC (Рисунок 9), в которой целевой ген *fliC* оказался под контролем модифицированного промотора бактериофага T5.



Примечание: *Bam*HI, *Hind*III – сайты рестрикции; 6His – регион, кодирующий шесть гистидинов; ATG – стартовый кодон, кодирующий метионин; lacO – лактозный оперон; T5 pr – модифицированный промотор бактериофага T5; Amp – ген устойчивости к ампициллину; to – регион остановки транскрипции; CoIE1 – участок инициации плазмидной репликации; пр – пар нуклеотидов.

Рисунок 9 – Схема генно-инженерной конструкции pQE-30-FliC, предназначенной для синтеза рекомбинантного белка FliC

Секвенирование нуклеотидных последовательностей гена *fliC* осуществляли по методу Сэнгера. Последовательность гена *fliC* из штамма PA-103 соответствовала последовательности нативного белка флагеллина *P. aeruginosa* (база данных GenBank), сравнение двух нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе «Omega 2.0».

На рисунке 10 представлена аминокислотная последовательность рекомбинантного белка FliC, рассчитанная исходя из результатов секвенирования.

```

MRGSHHHHHHGSVLTVNTNIASLNTQRNLNNSASLNTSLQRLSTGSRINSA
KDDAAGLQIANRLTSQVNGLVATKNANDGISLAQTAEGALQQSTNILQRM
RDLSQLSANGSNSDSERTALNGEVKQLQKELDRISNTTTFGGKRLLDGSFGV
ASFQVGSAAANEIISVGIDEMSAESLNGTYFTATGGGAVTAATASGTVDIAIGIT
GGSVNVKVDKMGNETAGQAAAKIAAAVNDANVGIGAFTDGAQISYVSKA
SADGTTSAVSGVAITDTGSTGAGTAAGTTTFTTEANDTVAKIDISTAKGAQSA
VLVIDEAIKQIDAQRADLGAVQNRFDNTINNLKNIGENVSAARGRIEDTDFAA
ETANLTKNQVLQQAGTAILAQANQLPQSVLSLLR
  
```

Рисунок 10 – Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка FliC. Подчеркнута дополнительная последовательность, содержащая 6 гистидинов

Для проведения культивирования продукта рекомбинантного белка FliC из чашки Петри петлей отбирали изолированную колонию с четкой морфологией и переносили в LB среде с антибиотиками, с целью отбора клеток, содержащих плазмиды с маркерами устойчивости (Рисунок 11). Ампициллин блокирует синтез клеточной стенки у бактерий, а канамицин ингибирует синтез белка, поэтому только трансформированные клетки могут расти в условиях данного отбора.



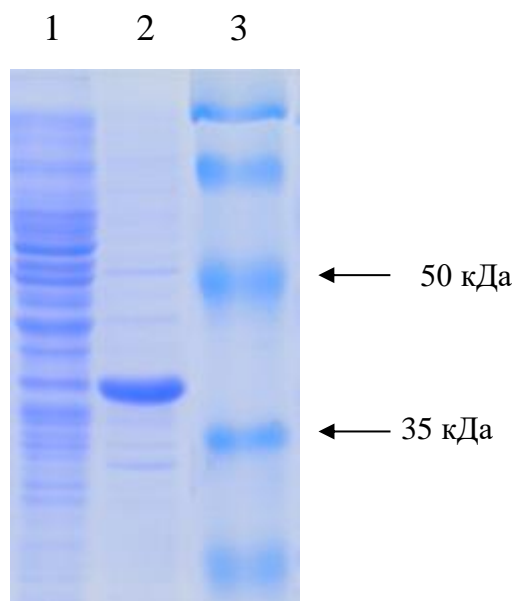
Рисунок 11 – Колонии штамма *E. coli* pQE-30-FliC - продуцента рекомбинантного белка FliC на LB среде с антибиотиками (ампициллин и канамицин)

Синтез рекомбинантного белка FliC осуществляли в сконструированном штамме-продуценте, экспрессию целевого гена в котором инициировали добавлением изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ). В момент экспоненциального роста (при оптической плотности культуры 0,5) добавляли химический индуктор экспрессии генов, рабочая концентрация которого составляла 1 мМ. Выход белка из 1 литра среды культивирования составил 2 г/л.

Белковые продукты анализировали путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли (Раздел 2.2.1).

В результате проведенной работы при электрофоретическом анализе белковых продуктов, полученных при культивировании клеток *E. coli* с конструкцией pQE-30-FliC после индукции экспрессии (добавление ИПТГ),

идентифицирован рекомбинантный белок с молекулярной массой 40 кДа, что соответствовало расчетным данным (40,7 кДа) (Рисунок 12).



Примечание: Дорожки на электрофореграмме: 1 – образец, содержащий белки из клеток штамма-продуцента FliC, полученные при выращивании штамма-продуцента в отсутствии индуктора (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид, ИПТГ); 2 – образец, содержащий белки штамма-продуцента FliC, полученные при выращивании биомассы в присутствии индуктора ИПТГ; 3 – маркер молекулярной массы белка (стрелками отмечены молекулярные массы двух маркерных белков).

Рисунок 12 – Электрофореграмма образцов в ПААГ, полученных в результате экспрессии гена *fliC*, встроенного в плазмиду pQE-30 в клетках *E. coli* штамма M15

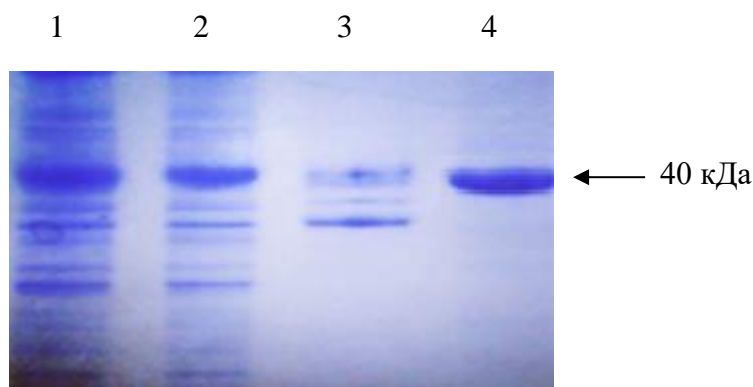
Измерение концентрации рекомбинантного белка FliC в растворе проводили на спектрофотометре при длине волны 280 нм. Значение коэффициента экстинкции (0,7), использованное в расчётах, было предварительно вычислено с использованием программы «Omiga 2.0».

3.2. Очистка рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa*

Очистку рекомбинантного белка FliC проводили в два этапа: непосредственное получение телец включения и их дальнейшее освобождение от

примесей. Полученные белковые образцы анализировали методом электрофореза в ПААГ.

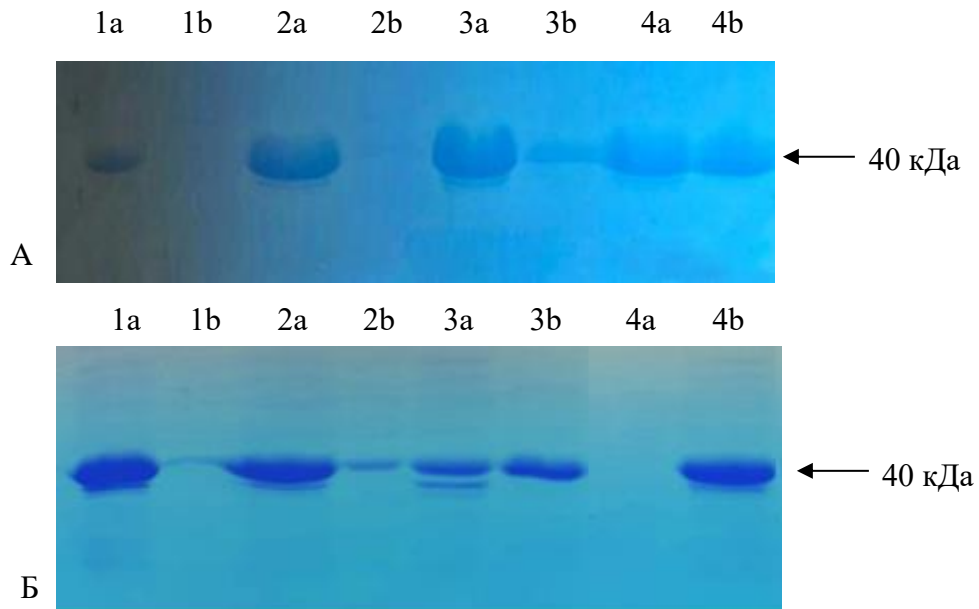
Бактериальные клетки, содержащие целевой рекомбинантный продукт, растворяли в литическом буфере и после проведения ультразвуковой дезинтеграции осаждали нерастворимую фракцию центрифугированием. Методом электрофореза в супернатанте выявили белки клеток штамма-продуцента и невысокое содержание рекомбинантного белка FliC (Рисунок 13, дор. 1). Осадок ресуспендировали и подвергали ферментативной обработке РНКазой и ДНКазой, а затем - ультразвуковой дезинтеграции. При повторном центрифугировании рекомбинантный белок FliC выпадал в осадок, в то время как белки клеток штамма-продуцента оставались в супернатанте (Рисунок 13, дор. 2). Для дальнейшего удаления примесей белков клеток штамма-продуцента осадок ресуспендировали в промывочном буфере и повторно центрифугировали. В результате супернатант содержал небольшое количество целевого рекомбинантного продукта, но при этом происходило удаление большей части примесей белков клеток штамма-продуцента (Рисунок 13, дор. 3), а осадок содержал тельца включения, состоящие в основном из рекомбинантного белка FliC (Рисунок 13, дор. 4).



Примечание: Дорожки на электрофореграмме: 1, 2, 3 – образцы супернатантов, полученных в процессе очистки телец включения; 4 – образец телец включения, содержащих рекомбинантный белок FliC.

Рисунок 13 – Электрофореграмма в ПААГ образцов телец включения, содержащих рекомбинантный белок FliC с молекулярной массой 40 кДа

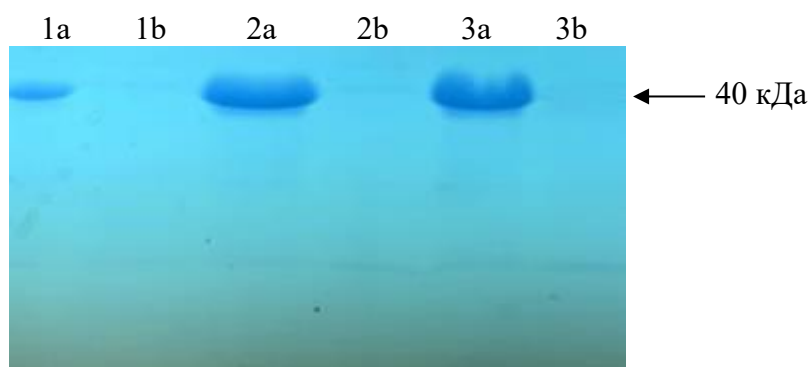
Для разработки оптимального метода очистки проведена оценка растворимости рекомбинантного белка FliC, содержащегося в тельцах включения (Рисунок 14). Методом электрофореза в ПААГ установлено, что целевой рекомбинантный продукт тяжело поддавался растворению при инкубации в буфере, содержащем 8 М мочевины. Так, через один час инкубации в буфере с мочевиной в режиме постоянного перемешивания наблюдалось небольшое количество растворенного рекомбинантного белка FliC. Через 12 ч в растворенное состояние переходила примерно половина рекомбинантного белка FliC (Рисунок 14А). На следующем этапе проводили исследование растворимости рекомбинантного белка FliC из телец включения при инкубации в буфере, содержащем 6 М гуанидин гидрохлорид. Методом электрофореза в ПААГ было установлено, что через час инкубации примерно половина рекомбинантного белка FliC перешла в растворимую форму, а через 12 ч наблюдалось его полное растворение (Рисунок 14Б).



Примечание: (А – буфер, содержащий 8 М мочевины; Б – буфер, содержащий 6 М гуанидин гидрохлорид). Дорожки на электрофореграмме: 1, 2, 3, 4 – образцы, полученные при растворении рекомбинантного белка FliC из телец включения при инкубации в буфере в течение 15 мин, 30 мин, 1 ч и 12 ч соответственно; а – образцы осадков после центрифугирования; б – образцы супернатантов после центрифугирования.

Рисунок 14 – Анализ растворимости рекомбинантного белка FliC из телец включения в буферных растворах по данным электрофореза в ПААГ

Супернатант, полученный после растворения рекомбинантного белка FliC из телец включения в буферном растворе, содержащем 6 М гуанидин гидрохлорид, подвергали аффинной хроматографии с использованием никель-сефарозы. Однако применение данного метода очистки рекомбинантного FliC оказалось неэффективным, что, возможно связано с высокой гидрофобностью белка. В связи с этим, апробирован альтернативный метод очистки, на первом этапе которого проведено исследование растворимости телец включения, содержащих рекомбинантный белок FliC в буферах мочевины с разной концентрацией (8, 4 и 2 М), инкубацию в буферных растворах проводили в течение 30 мин. После инкубации нерастворимые компоненты осаждали центрифугированием. Методом электрофореза в ПААГ установлено, что в описанных условиях весь рекомбинантный белок FliC оставался в нерастворимом состоянии (Рисунок 15).

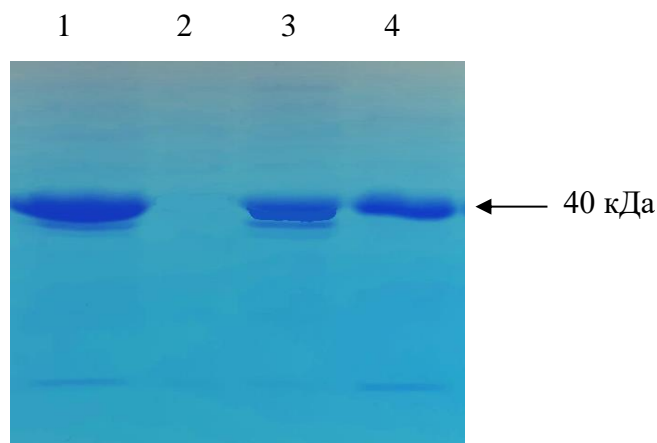


Примечание: Дорожки на электрофореграмме: 1, 2, 3 – образцы, полученные при растворении рекомбинантного белка FliC из телец включения при инкубации в буфере, содержащем мочевины в концентрации 8 М, 4 М и 2 М соответственно; а – образцы осадков после центрифугирования; б– образцы супернатантов после центрифугирования.

Рисунок 15 – Анализ растворимости рекомбинантного белка FliC из телец включения в буферных растворах с различной концентрацией мочевины по данным электрофореза

Поскольку рекомбинантный белок FliC, содержащийся в тельцах включения, не растворялся в буферном растворе мочевины, это свойство было решено использовать для удаления примесей других белков. Для этого тельца включения ресуспендировали в буферном растворе с 4 М мочевиной и инкубировали 30 мин

(Рисунок 16, дор. 1) с последующим центрифугированием. При этом, как было показано на электрофорезе в ПААГ, супернатант не содержал потерь целевого продукта (Рисунок 16, дор. 2). Далее рекомбинантный белок FliC растворяли в течение 12 ч в буферном растворе с 6 М гуанидин гидрохлоридом с последующим центрифугированием и удалением нерастворимого осадка. Полученный супернатант, содержащий рекомбинантный белок FliC (Рисунок 16, дор. 4), подвергли диализу против 50 мМ Tris-HCl буфера, pH 9,0. Оценку чистоты полученной белковой фракции рекомбинантного белка FliC проводили при помощи обработки результатов электрофореза в ПААГ с использованием программного обеспечения Phoretix 1D, (степень чистоты составила 97,6 %).



Примечание: Дорожки на электрофореграмме: 1 – образец телец включения, ресуспендированных в буферном растворе с 4 М мочевиной; 2 – образец супернатанта после центрифугирования ресуспендированных в буферном растворе с 4 М мочевиной телец включения; 3 – образец телец включения после инкубации в буферном растворе с 6 М гуанидин гидрохлоридом; 4 – образец супернатанта, содержащего рекомбинантный белок FliC, после осаждения обработанных буферным раствором с 6 М гуанидин гидрохлоридом телец включения.

Рисунок 16 – Электрофореграмма образцов при получении очищенного препарата рекомбинантного белка FliC

В результате проведенной работы разработан альтернативный метод очистки белка, который позволяет получать не токсичный и высокоочищенный продукт с чистотой 97,6 %. Данный метод позволяет существенно снизить затраты на производственный процесс и сделать его более эффективным.

3.3. Исследование иммунологических свойств рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa*

3.3.1. Изучение токсичности рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa*

Определение токсичности является важным этапом в рамках доклинической оценки безопасности препарата. Данное исследование направлено на выявление характера и степени повреждающего действия исследуемого рекомбинантного белка FliC на организм лабораторных животных.

In vivo изучена зависимость токсических эффектов от дозы рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* (Таблица 1).

При оценке токсических свойств учитывали: вес животных, падеж, а также проводили оценку поведенческого фенотипирования мышей.

Таблица 1 – Результаты изменения массы тела мышей после введения рекомбинантного FliC *P. aeruginosa* в различных дозах

Препарат (Доза введения)	Средняя масса тела мышей по дням, гр (M ± SD)								Увеличение массы через 7 сут	
	Исходна я	1й день	2й день	3й день	4й день	5й день	6й день	7й день	гр	%
FliC 25 мкг	19,8 ±0,87	20,0 ±0,92	20,5 ±0,98	21,0 ±1,2	21,4 ±1,21	22,0 ±1,3	22,5 ±1,38	23,1 ±1,3	3,3 ±0,9	14,2
FliC 50 мкг	20,1 ±1,0	20,3 ±1,1	20,8 ±0,98	21,3 ±1,0	21,8 ±1,12	22,2 ±1,25	22,6 ±1,2	23,2 ±1,34	3,1 ±1,0	13,3
FliC 100 мкг	20,3 ±1,20	20,5 ±1,1	20,9 ±1,13	21,3 ±1,28	21,8 ±1,3	22,4 ±1,38	22,8 ±1,3	23,4 ±1,28	3,1 ±0,8	13,2
Физ-р. 0,9 % Контроль	20,3 ±1,11	20,6 ±1,13	20,9 ±1,37	21,4 ±1,40	21,9 ±1,54	22,5 ±1,46	23,1 ±1,4	23,6 ±1,41	3,3 ±0,9	13,9

В эксперименте использовали белых беспородных мышей массой 18 – 20 г в количестве 10 особей на группу. Препарат рекомбинантного белка FliC вводили внутривентриально в дозах 25, 50 и 100 мкг на животное.

В течение 7 дней фиксировали общее состояние мышей, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, состояние волосяного покрова, потребление корма и воды. В ходе исследования у мышей всех опытных групп не выявлено отклонений от нормального физиологического состояния.

Исследования на животных показали, что иммунизация рекомбинантным белком FliC не вызывала токсические реакции в зависимости от дозы препарата.

3.3.2. Исследование иммуногенных свойств рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa*

Для постановки экспериментов по изучению иммуногенных свойств рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* производили трехкратную внутрибрюшинную иммунизацию мышей с интервалами в две недели, собирая сыворотки от пяти животных после каждого введения (Таблица 2).

Таблица 2 – Динамика титров антител в сыворотке крови мышей после трехкратной внутрибрюшинной иммунизации рекомбинантным белком FliC в дозе 50 мкг в ИФА

Иммунизация	День забора сыворотки	Титр антител (ср. значение)	95 % ДИ
Первая	10	1:128 000	1:52 000 - 1:185 000
Вторая	10	1:512 000	1:212 000 - 1:755 000
Третья	14	1:512 000	1:220 000 - 1:1 190 000
–	14	1:100	1:38 - 1:198

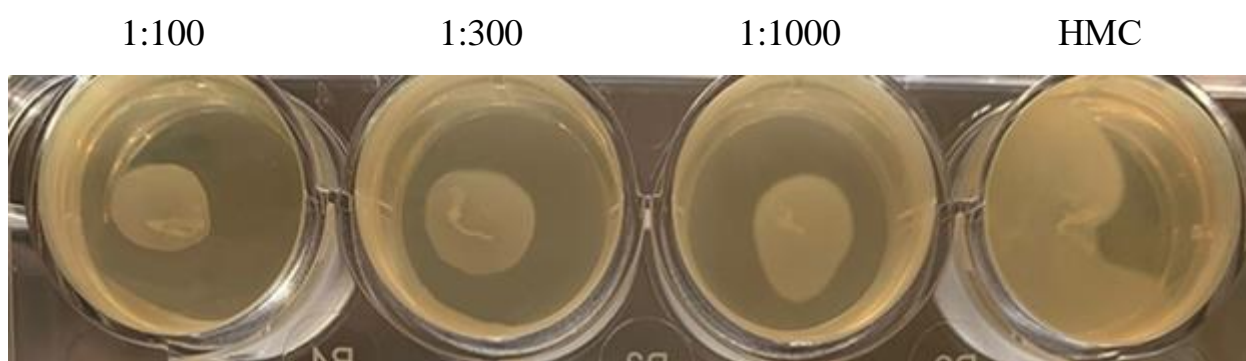
Примечание: 95% ДИ – 95% доверительный интервал.

В образцах сывороток крови, взятых от 5 иммунизированных белых беспородных мышей, выявлены высокие титры специфических антител. Установлено, что в группе животных, которым двукратно вводили

рекомбинантный белок FliC, титр антител составлял 1:512 000. Трехкратная иммунизация не обеспечивала статистически значимого увеличения титров специфических антител. В сыворотках интактных мышей титр антител не превышал разведение 1:100.

Для оценки функциональной активности специфических антител провели исследование их влияния на подвижность бактериальных клеток *P. aeruginosa* в полужидком агаре. В тестируемых сыворотках титр антител соответствовал разведению 1:512 000.

В результате экспериментов выявлено, что культура *P. aeruginosa* в контрольных лунках с добавлением нормальной мышьяной сыворотки (далее – НМС) разрасталась почти по всей поверхности контрольных лунок (Рисунок 17). В лунках с добавлением иммунных сывороток радиус зоны роста ограничивался 3-4 мм, что свидетельствовало о задержке роста бактерии и, повидимому, связано с наличием в сыворотках специфических антител, которые способны препятствовать колонизации бактерий в агаре (Рисунок 17). Ингибирующая активность иммунных сывороток в отношении тест-штамма оставалась значимой независимо от степени их разведения.



Примечание: 1:100; 1:300; 1:1000 – разведение сывороток по отношению к среде, НМС – нормальная мышьяная сыворотка.

Рисунок 17 – Подавление зоны роста подвижности *P. aeruginosa* иммунными сыворотками

Чтобы оценить влияние полученных иммунных сывороток на биопленкообразование (далее - БПО) *P. aeruginosa* штамма РА-103 в лунки

96 луночного культурального планшета вносили сыворотку полученную к *P. aeruginosa* и сыворотку к рекомбинантному белку FliC, в предложенных разведениях (Таблица 3). В качестве отрицательного контроля использовали НМС.

Таблица 3 – Влияние полученных сывороток на БПО *P. aeruginosa* штамма РА-103

Титр антител в сыворотке	БПО <i>P. aeruginosa</i> штамма РА-103 (ед, ОП690), Ме (Q1-Q3),		
	Образцы		
	Сыворотка к <i>P. aeruginosa</i> (n=10)	Сыворотка к рекомбинантному белку FliC (n=10)	НМС (контроль) (n=10)
1:512 000	0,12 (0,10-0,14)*	0,14 (0,12-0,15)*	0,44 (0,43-0,45)
1:256 000	0,14 (0,12-0,14)*	0,16 (0,14-0,17)*	0,46 (0,45-0,47)
1:128 000	0,15 (0,14-0,15)*	0,18 (0,17-0,19)*	0,45 (0,44-0,46)
1:64 000	0,17 (0,16-0,18)*	0,22 (0,21-0,23)*	0,50 (0,49-0,51)
1:32 000	0,21 (0,20-0,23)*	0,29 (0,27-0,30)*	0,48 (0,47-0,49)
1:16 000	0,34 (0,32-0,35) *	0,40 (0,38-0,42)	0,51 (0,50-0,51)
1:8000	0,47 (0,44-0,48)	0,45 (0,44-0,47)	0,50 (0,48-0,51)
1:4000	0,50 (0,47-0,53)	0,51 (0,48-0,52)	0,49 (0,47-0,51)

Примечание: * $p < 0,05$ — достоверность различий по сравнению с контролем (Критерий Манна-Уитни).

В результате показано, что полученная сыворотка к рекомбинантному белку FliC с титром специфических антител 1:32 000 приводила к достоверному снижению БПО по сравнению с контрольными лунками. Сыворотка полученная к *P. aeruginosa* снижала интенсивность БПО, при титре антител 1:16 000.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сыворотки к рекомбинантному белку FliC, содержат специфические антитела, которые

вероятно, блокируют активность флагеллиновых белков, играющих роль в адгезии бактерий к поверхности, препятствуя начальной стадии образования биопленок.

На следующем этапе работы представляло интерес изучить протективную активность рекомбинантного белка FliC и провести оценку влияния гидроксида алюминия при сочетанном введении с антигеном на формирование иммунного ответа, в сравнении с вакциной РВС содержащей рекомбинантные белки наружной мембраны *P. aeruginosa*. Белых беспородных мышей, массой 14 – 16 г, формировали в 4 группы, численностью по 50 голов. Животных двукратно с интервалами в 14 дней иммунизировали тестируемыми препаратами:

1) Рекомбинантным белком FliC в дозе 50 мкг;

2) Рекомбинантным белком FliC 50 мкг сорбированном на Al(OH)₃ в соотношении 1:1;

3) Рекомбинантной вакциной синегнойной РВС в дозе 0,5 мл.

В качестве контроля использовали интактных мышей.

Через 14 дней после второй иммунизации опытные группы животных заражали живой вирулентной культурой *P. aeruginosa* штамма РА-103 в дозах 12,5; 25; 50; 100; 200 млн м.к. Контрольную группу инфицировали в дозах 6,25; 12,5; 25; 50; 100.

В группе мышей, иммунизированных рекомбинантным белком FliC (группа № 1), и сорбированным на Al(OH)₃ в соотношении 1:1 (группа № 2) значение ЛД₅₀ соответственно составило 107,1 млн м.к., а индекс эффективности соответствовал 3,0 и 3,48, что свидетельствовало о протективном эффекте (Таблица 4, группа 5). Значение ЛД₅₀ для контрольной группы животных, инфицированных *P. aeruginosa*, составило 32,9 млн м.к (Таблица 4, группа 4).

Иммунизация мышей рекомбинантным белком FliC, сорбированным на гидроксида алюминия, не привела к статистически значимому увеличению индекса эффективности защитных свойств по сравнению с группой, в которой проводилась иммунизация только рекомбинантным белком FliC. Полученные данные могут свидетельствовать об отсутствии синергического эффекта между данным

адьювантом и исследуемым антигеном в формировании протективного иммунитета.

Сравнительный анализ эффективности показал, что рекомбинантный белок FliC по способности индуцировать протективный иммунитет не уступал рекомбинантной вакцине РВС, использованной в качестве референсного препарата.

Таблица 4 – Протективная активность рекомбинантного белка FliC при внутрибрюшинном заражении мышей *P. aeruginosa* PA-103

Группа животных	Доза заражения, млн м.к.	Количество мышей, Всего/Павших	ЛД ₅₀ , млн м.к. (ДИ)	ИЭ
Группа № 1 – мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC	200	10/10	107,1 (65,3– 158,9)	3,0
	100	10/3		
	50	10/2		
	25	10/0		
	12,5	10/0		
Группа № 2 – мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC сорбированным на Al(OH) ₃	200	10/9	114,8 (74,2– 205,6)	3,48
	100	10/3		
	50	10/1		
	25	10/0		
	12,5	10/0		
Группа № 3 – мыши, иммунизированные рекомбинантной вакциной синегнойной РВС	200	10/10	100,0 (70,2– 159,5)	3,0
	100	10/4		
	50	10/1		
	25	10/0		
	12,5	10/0		
Группа № 4 – контроль (неиммунизированные мыши)	100	10/10	32,9 (22,1– 48,2)	-
	50	10/7		
	25	10/3		
	12,5	10/1		
	6,25	10/0		
Примечание: (ДИ) – доверительный интервал, ИЭ – индекс эффективности.				

3.3.3. Изучение адьювантных свойств флагеллина *P. aeruginosa*

Основной целью данного раздела работы явилось изучение протективной и адьювантной активности рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa*. Учитывая известные данные по адьювантным свойствам флагеллина *S. typhimurium*, представляло интерес оценить аналогичный потенциал у рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa*. Опыты по активной защите включали в себя иммунизацию мышей композицией, содержащей рекомбинантный белок FliC и поверхностный антиген *K. pneumoniae*, выбранный в качестве антигенной мишени для оценки адьювантного эффекта. Особое внимание также уделили чистоте полученного препарата, остаточное содержание ЛПС контролировали для исключения ложноположительных результатов, связанных с его неспецифическим иммуностимулирующим действием. Это обусловлено тем, что рекомбинантный белок FliC был синтезирован в клетках «родительского штамма» *E. coli*, и конечный продукт мог содержать примесь бактериальных эндотоксинов, в частности ЛПС клеточной стенки бактерий *E. coli*. Известно, что ЛПС способен индуцировать активацию TLR4, проявляя адьювантные свойства и повышая иммунный ответ [125].

Для оценки содержания эндотоксина в препарате рекомбинантного белка FliC проводили определение его концентрации с использованием ЛАЛ-теста по конечной точке. В результате проведенного исследования определено содержание эндотоксина в препарате, которое соответствовало 390 ЕЭ/мл; а его количество в одной иммунизирующей дозе – 19,5 ЕЭ/мл, что не превышало допустимых значений, изложенных в Фармакопее РФ XIV ОФС 42-0062-007 «Бактериальные эндотоксины». Низкий уровень эндотоксинов в препарате позволяет дифференцировать TLR5-опосредованный сигнал, индуцированный флагеллином, от потенциального TLR4-зависимого сигнала ЛПС, что подтверждает специфичность развившегося иммунного ответа.

Для постановки экспериментов по изучению протективных и адьювантных свойств формировали 6 групп животных, которым вводили исследуемые препараты внутривнутрибрюшинно двукратно с интервалами в 14 дней (Таблица 5).

Мышам вводили:

- 1) Рекомбинантный белок FliC в дозе 50 мкг на мышь (группа № 1);
- 2) Смесь рекомбинантного белка FliC и поверхностного антигена *K. pneumoniae* в соотношении 1:1 (группа № 2, группа № 5);
- 3) Поверхностный антиген *K. pneumoniae* (группа № 4).

В качестве контроля использовали интактных мышей (группа № 3, группа № 6).

Мышей контрольных и опытных групп заражали штаммами *P. aeruginosa* PA-103 или *K. pneumoniae* № 204. Значение ЛД₅₀ для контрольной группы животных, инфицированных *P. aeruginosa*, составило 29,7 млн м.к., а для контрольной группы животных, инфицированных *K. pneumoniae* – 35,0 млн м.к. (Таблица 5). В группе мышей, иммунизированных рекомбинантным белком FliC и инфицированных *P. aeruginosa* (Таблица 5, группа № 1), значение ЛД₅₀ составило 91,7 млн м.к., (индекс эффективности соответствовал 3,1), что свидетельствовало о протективном эффекте введенного рекомбинантного белка FliC в отношении *P. aeruginosa* (Таблица 5, группа № 3). При экспериментальном внутривнутрибрюшинном заражении *K. pneumoniae* мышей, иммунизированных комбинацией FliC и поверхностным антигеном *K. pneumoniae* (Таблица 5, группа № 5), значение ЛД₅₀ составило 218,0 млн м.к., а (индекс эффективности – 6,1). При введении только поверхностного антигена *K. pneumoniae* (Таблица 5, группа № 4) после внутривнутрибрюшинного заражения родственной культурой, значение ЛД₅₀ соответствовала 129,6 млн м.к., а (индекс эффективности – 3,6).

Адьювантные свойства флагеллина подтверждаются увеличением индекса эффективности в группах, иммунизированных комбинацией рекомбинантного FliC и антигена *K. pneumoniae* (Таблица 5, группа № 2, группа № 5). При этом защита формировалась как против родственного (гомологичного), так и против неродственного (гетерологичного) штамма за счет перекрестной реактивности, что

свидетельствует о наличии общих, иммуногенно значимых эпитопов между использованными антигенами и штаммами.

Таблица 5 – Протективные и адьювантные свойства рекомбинантного белка FliC при внутрибрюшинном заражении мышей *P. aeruginosa* штамм PA-103 и *K. pneumoniae* штамм № 204

Группа животных	Заражение		Количество мышей, павших/всего	ЛД ₅₀ , млн м.к. (ДИ)	ИЭ
	штамм	доза заражения, млн м.к.			
Группа № 1 – мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC	<i>P. aeruginosa</i> PA-103	200	7/8	91,7 (60,3–147,9)	3,1
		100	5/8		
		50	1/8		
		25	0/8		
		12,5	0/8		
Группа № 2 – мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC и поверхностным антигеном <i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i> PA-103	200	4/8	154,0 (117,5–354,8)	5,6
		100	2/8		
		50	0/8		
		25	0/8		
		12,5	0/8		
Группа № 3 – контроль (неиммунизированные мыши)	<i>P. aeruginosa</i> PA-103	100	8/8	29,7 (19,5–44,7)	–
		50	6/8		
		25	3/8		
		12,5	1/8		
		6,25	0/8		
Группа № 4 – мыши, иммунизированные поверхностным антигеном <i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> № 204	200	4/8	129,6 (85,1–223,9)	3,6
		100	3/8		
		50	2/8		
		25	0/8		
		12,5	0/8		
Группа № 5 – мыши, иммунизированные рекомбинантным белком FliC и поверхностным антигеном <i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> № 204	200	2/8	218,0 (166,0–501,2)	6,1
		100	1/8		
		50	0/8		
		25	0/8		
		12,5	0/8		
Группа № 6 – контроль (неиммунизированные мыши)	<i>K. pneumoniae</i> № 204	100	8/8	35,0 (25,1–50,1)	–
		50	5/8		
		25	3/8		
		12,5	0/8		
		6,25	0/8		

Примечание: (ДИ) – доверительный интервал, ИЭ – индекс эффективности.

В целом по представленному разделу работы можно сделать заключение, что рекомбинантный очищенный белок FliC *P. aeruginosa* является нетоксичным и характеризуется комплексом иммунологически значимых свойств: протективностью, антигенностью и адьювантностью. Полученные к нему иммунные сыворотки содержат специфические антитела, подавляющие ключевые факторы вирулентности – подвижность и способность к БПО *P. aeruginosa*.

Установленные иммунобиологические свойства рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* обуславливают необходимость создания специфичных средств его детекции, применимых на различных стадиях производства и очистки. В связи с этим, целью следующего этапа исследования явилось получение моноклональных антител к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa* для разработки метода ИФА, который позволит детектировать данный антиген.

3.4. Получение моноклональных антител к рекомбинантному флагеллину *P. aeruginosa* и их иммунохимическое исследование

3.4.1. Получение моноклональных антител к рекомбинантному флагеллину *P. aeruginosa*

Получение МкАт с помощью гибридомной технологии остается «золотым стандартом» для создания высокоспецифичных иммунореагентов. Важнейшими этапами работы являются: отбор стабильных клонов-продуцентов и оценка их иммунохимических свойств для последующего применения в детекции целевого белка.

В рамках первого этапа работы с использованием методик, изложенных в разделе 2.2.4, была получена панель из трех МкАт к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa*.

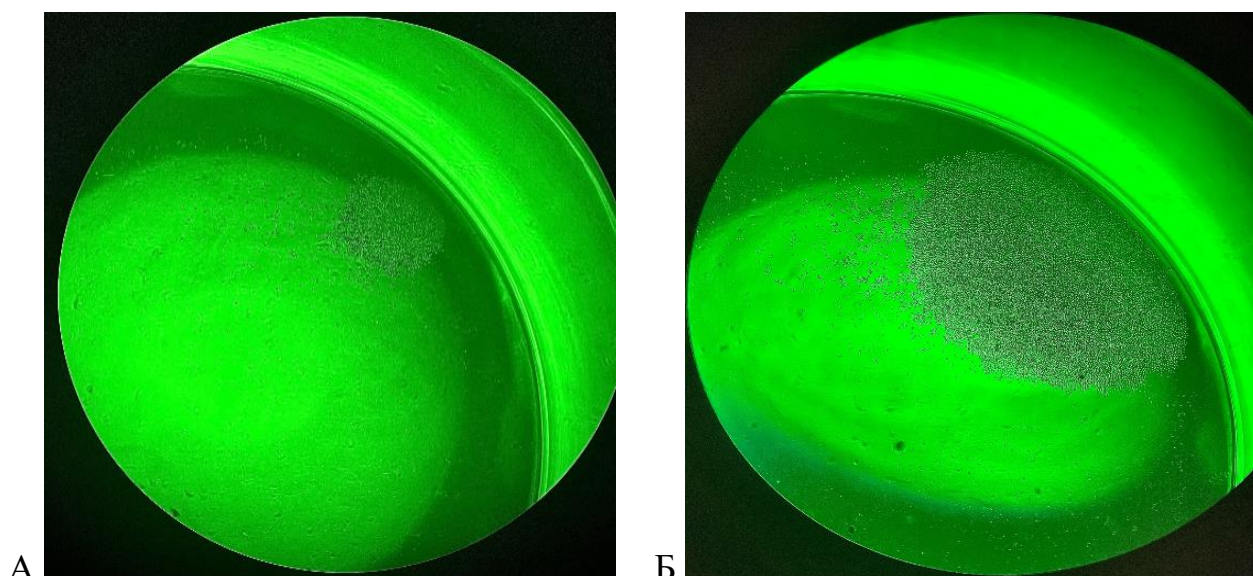
Для получения первичных гибридных культур мышей линии BALB/c иммунизировали рекомбинантным белком FliC *P. aeruginosa*. Гибридизацию

клеток проводили согласно протоколу (раздел 2.2.4). Соотношение клеток миеломы и иммунных спленоцитов мыши составляло 1:5 (15 млн. клеток NP и 75 млн. иммунных спленоцитов). После процедуры слияния, клетки вносили в три 96-ти луночных планшета с добавлением слоя фидерных клеток. В течение 14 дней клетки росли на селективной среде ГАТ, последующие 14 дней – на среде ГТ. Далее клетки переводили на обычную среду RPMI-1640.

В результате гибридизации из 288 засеянных лунок рост культур наблюдали в 200 лунках (эффективность слияния 69 %). По итогам первичного тестирования в непрямом ИФА из 200 растущих культур 32 являлись антителообразующими (эффективность иммунизации 16 %). Критериями дальнейшего отбора продуцентов служили устойчивая антитело-секретирующая активность (титр антител к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa* составил $\geq 1:640$) и способность к непрерывной пролиферации *in vitro* на протяжении трех месяцев.

На основании данных последующих тестирований и наблюдения за ростом культур для получения препаративных количеств МкАт были отобраны три наиболее активных и стабильных клона - 1B3, 1G5 и 1G10, продуцирующие антитела к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa*. В результате клонирования от каждой культуры удалось получить по одному клону: 1B3/D2 (МкАт-1), 1G5/G7 (МкАт-2) и 1G10/D6 (МкАт-3). Титр антител в ИФА в среде культивирования гибридом составлял $\geq 1:1280$.

Контроль роста клонов гибридных культур проводили микроскопическим методом. В качестве примера на Рисунке 18 показана пролиферативная активность клона 1B3/D2, демонстрирующая рост популяции клеток на 7 и 10 день после клонирования.



Примечание: А – 7 день после клонирования; Б – 10 день после клонирования.

Рисунок 18 – Рост клона 1В3/Д2

На следующем этапе для подтверждения специфичности и функциональной активности полученных МкАт провели изучение их основных иммунохимических свойств.

3.4.2. Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител

Специфичность полученных МкАт оценивали путём анализа их иммунохимических свойств, а именно: определения классов и изотипов антител, оценки перекрёстной реактивности и специфического связывания в иммуноблоттинге.

Для концентрирования и первичной очистки МкАт от балластных белков использовали метод осаждения сульфатом аммония (раздел 2.2.4).

Определение класса и изотипа полученной γ -глобулиновой фракции МкАт проводили методом непрямого ИФА. Планшеты сенсibilizировали рекомбинантным белком FlіС в концентрации 5 мг/мл в КББ. Высоленные γ -глобулиновые фракции МкАт к рекомбинантному белку FlіС титровали в диапазоне от 1:50 до 1:12800. В качестве вторичных антител использовали меченые

пероксидазой хрена козы антитела к IgA, IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 мыши в рекомендуемом инструкцией разведении 1:5000 (Таблица 6).

Таблица 6 – Определение изотипа МкАт к рекомбинантному белку FliC в ИФА

Образцы МкАт	Классы и подклассы иммуноглобулинов						
	IgA	IgM	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
МкАт-1	-	-	+	+	-	-	-
МкАт-2	-	-	+	-	-	+	-
МкАт-3	-	-	+	-	-	+	-

В результате установлено, что все три МкАт относятся к классу IgG, МкАт-1 относится к подклассу IgG1, а МкАт-2 и МкАт-3 – к подклассу IgG2b мыши.

Исследование взаимодействия МкАт с рекомбинантным белком FliC в иммуноблоттинге показало, что МкАт-1 (трек 1) и МкАт-2 (трек 3) специфически взаимодействовали с рекомбинантным белком FliC (Рисунок 19). Отсутствие взаимодействия МкАт-3 (трек 4) с иммобилизованным рекомбинантным белком FliC в проведенном анализе возможно указывает на то, что МкАт-3 распознаёт конформационно-зависимый эпитоп, который может разрушаться при денатурации белка в процессе подготовки образца для иммуноблоттинга. В качестве положительного контроля использовали поликлональную иммунную сыворотку к рекомбинантному белку FliC (трек 5), которая вероятно содержит смесь антител, направленных против множества эпитопов нативной и денатурированной формы флагеллина. Это может гарантировать получение четкого и достоверного сигнала в полосе, соответствующей молекулярной массе целевого белка. В качестве отрицательного контроля использовали МкАт к рекомбинантному белку OprF *P. aeruginosa* (трек 2). Выбор данного контроля обусловлен тем, что OprF является структурным белком наружной мембраны и не имеет гомологии с флагеллином, что позволяет исключить неспецифическое связывание и подтвердить специфичность детекции целевого белка полученными МкАт.



Дорожки: 1 – МкАт-1; 2 – МкАт к рекомбинантному белку OprF *P. aeruginosa* (отрицательный контроль); 3 – МкАт-2; 4 – МкАт-3; 5 – Поликлональная иммунная сыворотка (положительный контроль).

Рисунок 19 – Исследование специфичности полученных МкАт в иммуноблоттинге

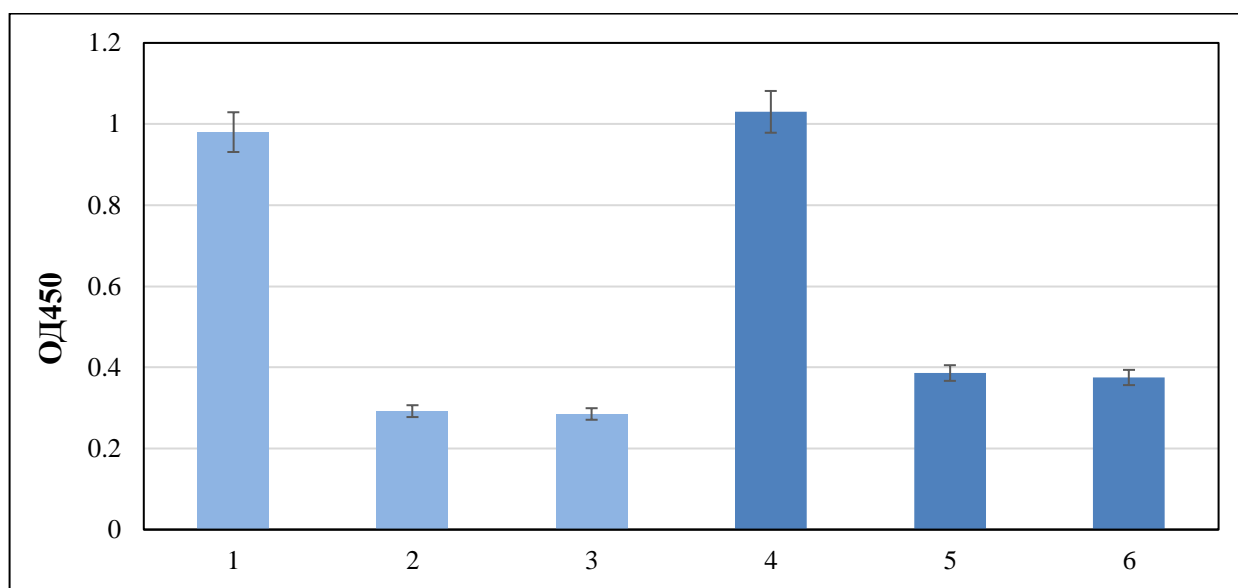
Для проведения дальнейших исследований получили препаративные количества МкАт из асцитной жидкости, накопленной в брюшной полости мышей после инокуляции гибридных клеток (Раздел 2.2.4). Концентрация белка в выделенных из асцитной жидкости МкАт-1 составила 16,7 мг/мл, МкАт-2 – 13,1 мг/мл, МкАт-3 – 11,9 мг/мл.

Определение эпитопной направленности МкАт к рекомбинантному белку FliC осуществляли методом «конкурентного» - варианта ИФА. С этой целью были приготовлены конъюгаты МкАт, меченные пероксидазой из корня хрена. Рабочие разведения конъюгатов подбирали методом титрования в непрямом ИФА. В результате для МкАт-1-ПХ и МкАт-2-ПХ были установлены разведения равные 1:500 и 1:1000, соответственно. Конъюгат МкАт-3-ПХ с низкой активностью (титр < 1:100), которая вероятно связана со слабой афинностью МкАт-3 в дальнейших исследованиях не использовали.

Для постановки «конкурентного» – варианта ИФА в лунки планшета одновременно вносили МкАт и МкАт-ПХ (МкАт, конъюгированные с пероксидазой хрена), в концентрации, соответствующей 50 % связыванию антител с антигеном, иммобилизованным на планшете. В качестве контроля использовали лунки с МкАт-ПХ. Реакцию проявляли добавлением субстратно-хромогенной смеси. Оптическую плотность проб, не содержащих антител, принимали за 100 %,

ингибирование связывания на 60 % и более считали полным, на 30 - 59 % - частичным, менее чем на 30 % - недостоверным; Степень связывания МкАт-ПХ позволяла определить специфичность используемой пары антител [21].

В результате титрования МкАт и МкАт-ПХ на планшетах с иммобилизованным рекомбинантным белком FliC в подобранной концентрации 0,75 мкг/мл определили титры антител, соответствующие точке 50 % связывания с сорбентом. Титр антител составил 1:1000 [21].



Дорожки: 1 – МкАт-1-ПХ (контроль); 2 – МкАт-1-ПХ + МкАт-2; 3 – МкАт-1-ПХ + МкАт-1; 4 – МкАт-2-ПХ (контроль); 5 – МкАт-2-ПХ + МкАт-1; 6 – МкАт-2-ПХ + МкАт-2.

Рисунок 20 – Результаты определения эпитопной направленности МкАт в «конкурентном» - варианте ИФА

Исследуемые пробы предварительно готовили в отдельных пробирках в соотношении 1:1, после чего готовые смеси вносили в лунки планшета.

Опытные пробы: МкАт-1-ПХ + МкАт-2 (трек 2); МкАт-1-ПХ + МкАт-1 (трек 3); МкАт-2-ПХ + МкАт-1 (трек 5); МкАт-2-ПХ + МкАт-2 (трек 6).

1. Контрольные пробы: МкАт-1-ПХ (трек 1); МкАт-2-ПХ (трек 4)

По результатам конкурентного анализа показана высокая перекрёстная конкуренция (> 60 % подавления связывания) между МкАт-1 и МкАт-2, что

указывало на их принадлежность к одному участку на молекуле рекомбинантного белка FliC (Рисунок 20).

Определение условий для сорбции МкАт осуществляли в прямом варианте ИФА при разных условиях (0,05 М карбонатно-бикарбонатный буфер, рН 9,6 и 0,15 М фосфатно-солевой буфер, рН 7,2). В результате анализа, показано, что состав буферных растворов и значений рН не влияли на способность МкАт-2 связываться с иммуносорбентом, в отличие от МкАт-2 и МкАт-3, которые сорбировались только в условиях КББ.

Полученные результаты свидетельствовали о возможности использования МкАт-2 в качестве распознающих при конструировании сэндвич-варианта ИФА для выявления рекомбинантного белка FliC.

3.4.3. Разработка иммуноферментного анализа для выявления рекомбинантного флагеллина *P. aeruginosa*

Разработку модельной системы для выявления рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* проводили с использованием полученных МкАт-2 и ПкАт [49, 50].

Концентрация ПкАт в иммуноглобулиновой фракции составила - 13,6 мг/мл (Раздел 2.2.4).

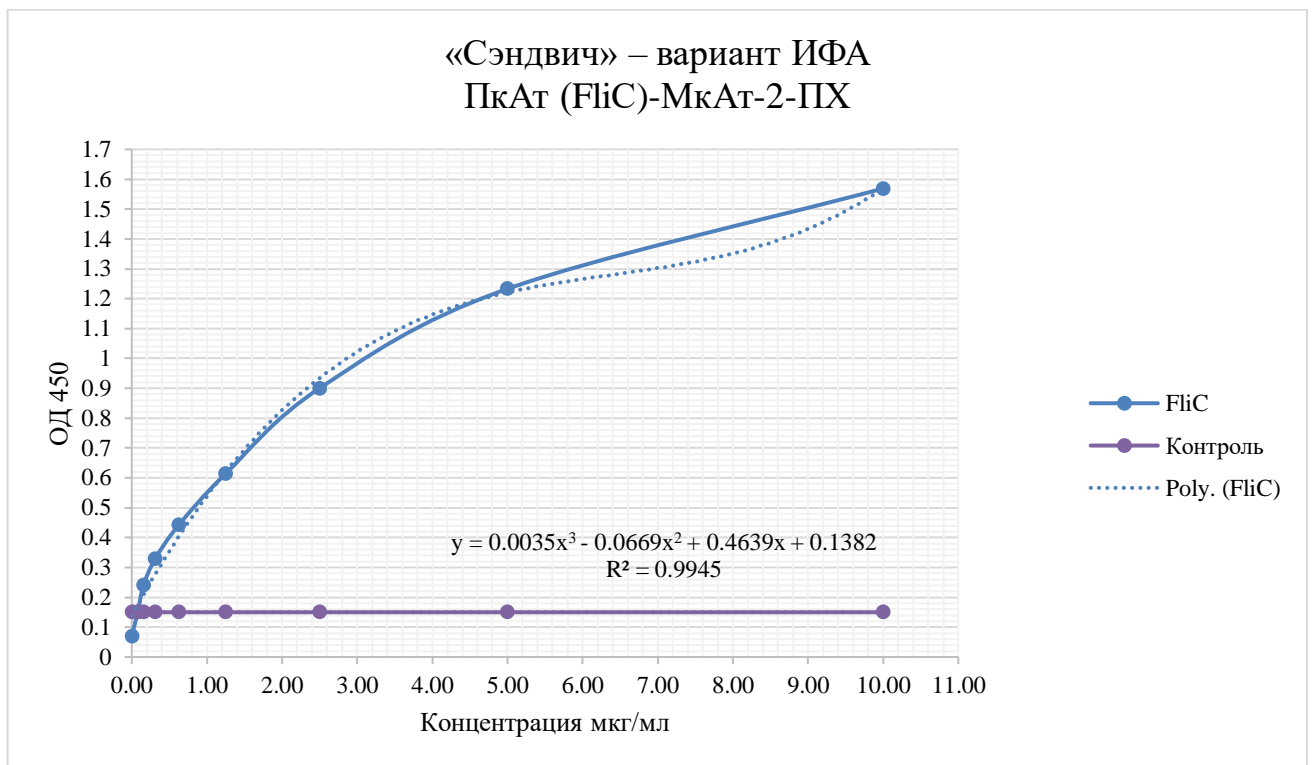
С целью создания иммуноферментного анализа для определения рекомбинантного белка FliC на первом этапе работы определяли оптимальную концентрацию ПкАт для сорбции на поверхности лунок полистиролового планшета и рабочее разведение конъюгата МкАт-2-ПХ. Концентрация ПкАт для сорбции составила 5 мкг/мл, а рабочее разведение конъюгата – 1:1000.

Калибровочные пробы готовили используя очищенный рекомбинантный белок FliC (чистота составила 97,6 %) в диапазоне концентраций от 5 до 0,03 мкг/мл.

Для постановки анализа планшет сенсibilизировали ПкАт в концентрации 5,0 мкг/мл в объеме 100 мкл/лунку и инкубировали в течение ночи при температуре

4 °С. Далее в лунки планшета вносили заранее приготовленные в отдельных пробирках серийные двукратные разведения рекомбинантного белка FliC в диапазоне концентраций от 5 до 0,03 мкг/мл. После инкубации в течение часа при температуре 37 °С проводили отмывку планшета буферным раствором ФСБ-твин и вносили конъюгат МкАт-2-ПХ в рабочем разведении 1:1000, затем проявляли реакцию субстратно-хромогенной смесью. В качестве отрицательного контроля использовали буфер для разведения калибровочных проб. Через 10 минут реакцию останавливали добавлением 0,5 М раствора серной кислоты. Реакцию оценивали по величине оптической плотности на фотометре с вертикальным ходом луча при длине волны 450 нм.

На Рисунке 21 представлен типичный калибровочный график зависимости концентрации белка от оптической плотности.



Примечание: FliC – исследуемый рекомбинантный белок, контроль – лунки с добавлением буфера, который использовали для разведения калибровочных проб.

Рисунок 21 – Результаты анализа с помощью «сэндвич» – варианта ИФА ПкАт-(FliC) – МкАт-2-ПХ

Чувствительность – минимально определяемая концентрация рекомбинантного белка FliC, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочной пробы, содержащей 0 мкг/мл, плюс 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение), мкг/мл.

В предварительных опытах была показана возможность детекции рекомбинантного белка FliC с чувствительностью 0,25 мкг/мл в «сэндвич» - варианте ИФА. Метод может быть использован в качестве стандартной процедуры для оценки выхода рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* на всех этапах его получения.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены три МкАт к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa*, два из которых направлены к одному участку молекулы белка, а также показана возможность использования МкАт и ПкАт для конструирования тест системы на основе ИФА для детекции рекомбинантного белка FliC в процессе его получения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний момент *P. aeruginosa* входит в группу микроорганизмов, включающую шесть бактерий-оппортунистов, объединенных термином ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*) представляющих опасность для населения различных стран [57, 161].

Лечение инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, является сложной терапевтической задачей [55]. Возбудитель обладает способностью к реализации всех ключевых механизмов формирования лекарственной устойчивости: низкой проницаемостью внешней мембраны, активным функционированием эффлюкс-систем и биосинтезом широкого спектра гидролизующих ферментов (β -лактамаз, включая металло- β -лактамазы) [67, 77, 102]. Такая ситуация требует создания лекарственных средств для стимуляции систем врожденного и приобретенного иммунитета, что особенно значимо для иммунокомпроментированных лиц.

Проблема также осложняется особенностями возбудителя, связанными с наличием большого количества факторов патогенности [37, 58]. Разработка эффективного иммунного препарата требует детального понимания роли каждого из этих факторов. Среди них ключевое значение имеет жгутик, обеспечивающий не только подвижность, но и процессы адгезии и формирования биоплёнок [43, 148]. Его структурный белок флагеллин выступает патоген-ассоциированным молекулярным паттерном (РАМР), распознаваемым Toll-подобным рецептором 5 (TLR5), что делает его перспективной мишенью для иммунотерапии [68, 95]. Данные литературы об успешном использовании флагеллина *S. typhimurium* в качестве адьювантного компонента вакцин-кандидатов подтверждают эту теорию [46].

Разработка эффективной вакцины требует не только выбора целевого антигена, но и научно-обоснованного подбора адьюванта. Последний играет ключевую роль в развитии иммунного ответа, что напрямую влияет на

эффективность иммунизации [104, 188, 190]. Целесообразность включения флагеллина *P. aeruginosa* как компонента вакцины против синегнойной инфекции может явиться перспективной стратегией, которая обеспечит быстрое формирование выраженного и длительного специфического иммунитета.

На основании анализа литературных данных, для исследования представлял интерес консервативный белок флагеллин (FliC) *P. aeruginosa*, являющийся структурным компонентом жгутика бактерии.

С целью получения рекомбинантной формы консервативного FliC *P. aeruginosa*, формирующего базальное тело жгутика бактерии, полноразмерную последовательность гена *fliC* синтезировали в результате ПЦР на основе матричной ДНК *P. aeruginosa* штамма PA-103 [16]. Амплифицированный ген *fliC*, клонировали с помощью коммерческого набора InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit, в результате чего его встраивали в промежуточную плазмиду pTZ57R [149]. Отбор рекомбинантных клонов проводили с помощью рестриктного анализа и секвенирования. Далее клонированный ген *fliC* встроили в плазмидный вектор pQE-30, предназначенный для регулируемой экспрессии в клетках *E. coli* штамма M15 по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III.

Как показали данные секвенирования клонированного гена *fliC*, кодируемая им аминокислотная последовательность совпадала с референс-последовательностью из базы данных GenBank.

При электрофоретическом анализе белковых продуктов, полученных при культивировании клеток *E. coli* с конструкцией pQE-30-FliC после индукции экспрессии добавлением ИПТГ, был идентифицирован рекомбинантный белок с молекулярной массой 40 кДа, что соответствовало расчетным данным (40,7 кДа).

Штамм *E. coli* pQE-30-FliC - продуцент рекомбинантного белка FliC депонирован в коллекцию штаммов ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова, а его новизна подтверждена патентом Российской Федерации № 2793753 С1 от 05.04.2023.

Для синтеза рекомбинантного белка FliC, применён созданный штамм-продуцент. Экспрессию целевого гена индуцировали химическим индуктором

экспрессии гена, который вносили в культуральную среду в концентрации 1 mM. Выход очищенного белка составил 2 г/л культуральной среды.

Поскольку рекомбинантный белок FliC являлся высокогидрофобным и трудно растворимым в буферах мочевины, используемых при аффинной хроматографии на никель-активированных сорбентах, потребовалась разработка оригинального метода очистки, который включал в себя несколько последовательных этапов [45].

Разработанный протокол очистки рекомбинантного FliC из телец включения содержащих рекомбинантный белок FliC позволил последовательно:

- 1) удалить основную массу белковых примесей при помощи предварительной экстракции в 4 М мочеvine и последующего центрифугирования;
- 2) перевести целевой белок в растворенное состояние путём денатурации в 6 М буферном растворе гуанидин гидрохлорида с последующим центрифугированием;
- 3) восстановить его нативную конформацию диализом в щелочном буфере Tris-HCl (50 mM, pH 9.0).

В результате проведенной работы разработан способ очистки рекомбинантного белка FliC, с чистотой 97,6 %. Данный метод позволяет существенно снизить затраты на производственный процесс и сделать его более эффективным.

С целью изучения иммунобиологических свойств, таких как антигенность, протективная и адьювантная активность, полученный рекомбинантный белок FliC охарактеризован по безопасности.

Для оценки безопасности, установления характера и выраженности повреждающего действия на организм экспериментальных животных провели исследование токсичности рекомбинантного белка FliC, в котором испытаны три дозы препарата (25, 50, 100 мкг). В эксперименте формировали три группы мышей массой 18 – 20 г по 10 особей на группу. Препарат рекомбинантного белка FliC вводили внутривентриально. В течение 14 дней наблюдали за общим состоянием мышей, особенностями их поведения, интенсивностью и характером двигательной

активности, состоянием волосяного покрова, потреблением корма и воды. В ходе эксперимента у животных опытных групп не выявлено отклонений от нормального физиологического состояния, введение рекомбинантного белка FliC не вызывало токсические реакции в зависимости от дозы препарата.

Для изучения иммуногенных свойств рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* производили трехкратную внутрибрюшинную иммунизацию мышей с интервалами в две недели, контролируя в сыворотках крови титр специфических антител у 5 животных. Установлено, что в группе животных, которым двукратно вводили рекомбинантный белок FliC, титр антител составлял 1:512 000. Трехкратная иммунизация не стимулировала статистически значимого увеличения титров специфических антител.

В ряде экспериментов полученные иммунные сыворотки протестированы *in vitro* на функциональную активность. Вначале оценивали их способность ингибировать подвижность *P. aeruginosa* штамма PA-103. В результате установлено, что иммунная сыворотка в разведениях 1:100; 1:300; 1:1000, подавляла распространение бактерий в полужидком агаре.

По литературным данным известно, что *P. aeruginosa* способна образовывать биопленки. В связи с этим представлял интерес оценить влияние полученных сывороток на способность БПО, в лунках полистиролового культурального планшета. В результате проведённых экспериментов установлено, что иммунная сыворотка к рекомбинантному белку FliC, имеющая титр специфических антител равный 1:32 000, вызывала статистически значимое снижение интенсивности БПО *P. aeruginosa* по сравнению с НМС. Полученные результаты показали, что специфические антитела к белку FliC содержащиеся в сыворотках предположительно блокируют адгезию бактерий и препятствуют инициации образования биоплёнок *in vitro*.

На следующем этапе работы представляло интерес изучить протективную активность рекомбинантного белка FliC и оценить влияние гидроксида алюминия при сочетанном введении с антигеном на формирование иммунного ответа.

В результате проведенной работы установлено, что иммунизация мышей рекомбинантным белком FliC, сорбированным на гидроксиде алюминия, не привела к статистически значимому увеличению индекса эффективности защитных свойств по сравнению с группой, в которой проводилась иммунизация только рекомбинантным белком FliC. Полученные данные могут свидетельствовать об отсутствии синергического эффекта между адьювантом и исследуемым антигеном в формировании протективного иммунитета.

Учитывая известные данные по адьювантным свойствам флагеллина *S. typhimurium*, представляло интерес оценить аналогичный потенциал у рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa*. Опыты по активной защите включали в себя иммунизацию мышей композицией, содержащей рекомбинантный белок FliC и поверхностный антиген *K. pneumoniae*, выбранный в качестве антигенной мишени для оценки адьювантного эффекта. Особое внимание было уделено чистоте полученного препарата, остаточное содержание ЛПС контролировали для исключения ложноположительных результатов, связанных с его неспецифическим иммуностимулирующим действием. Это обусловлено тем, что рекомбинантный белок FliC был синтезирован в клетках «родительского штамма» *E. coli*, и конечный продукт мог содержать примесь бактериальных эндотоксинов, в частности ЛПС клеточной стенки бактерий *E. coli*. Известно, что ЛПС способен индуцировать активацию TLR4, проявляя адьювантные свойства и повышая иммунный ответ.

Проверка препарата рекомбинантного белка FliC с помощью ЛАЛ-теста по конечной точке показала, что содержание эндотоксинов в препарате составило 390 ЕЭ/мл, в одной иммунизирующей дозе – 19,5 ЕЭ/мл, что не превышало допустимых значений для лекарственных средств, изложенных в Фармакопее ОФС 42-0062-007 «Бактериальные эндотоксины» РФ XIV. Низкий уровень эндотоксинов в препарате позволяет дифференцировать TLR5-опосредованный сигнал, индуцированный флагеллином, от потенциального TLR4-зависимого сигнала ЛПС, что подтверждает специфичность развившегося иммунного ответа.

С целью оценки адъювантного потенциала рекомбинантного белка FliC в рамках сочетанной иммунизации, в качестве целевого антигена выбран поверхностный антиген *Klebsiella pneumoniae* [179]. Иммунизацию мышей проводили внутривенно двукратно в дозе 50 мкг на мышь. Животных иммунизировали препаратами: 1) рекомбинантный белок FliC; 2) рекомбинантный белок FliC + поверхностный антиген *K. pneumoniae*, 3) поверхностный антиген *K. pneumoniae*. В качестве контроля использовали группу интактных мышей. Заражение проводили живыми вирулентными культурами *P. aeruginosa* штамма PA-103 и *K. pneumoniae* штамма № 204. В результате проведенных исследований показано, что рекомбинантный белок FliC *P. aeruginosa* обладал протективной активностью как самостоятельный иммуноген с ИЭ равным 3,1. При сочетанной иммунизации с поверхностным антигеном *K. pneumoniae*, рекомбинантный белок FliC проявлял тенденцию адъювантных свойств с ИЭ равным 6,1. При этом защита формировалась как против родственного (гомологичного), так и против неродственного (гетерологичного) штамма за счет перекрестной реактивности, что свидетельствует о наличии общих, иммуногенно значимых эпитопов между использованными антигенами и штаммами.

Установленные иммунобиологические свойства рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* обуславливают необходимость создания специфичных средств его детекции, применимых на различных стадиях производства и очистки. В связи с этим, целью следующего этапа исследования явилось получение МкАт к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa* для разработки метода ИФА, который позволит детектировать данный антиген.

В результате работы получены три гибридомы, продуцирующие МкАт заданной специфичности. Проведена наработка необходимых препаративных количеств МкАт для проведения дальнейших исследований и изучены их основные иммунохимические свойства [50]. Установлено, что все три МкАт относятся к классу IgG, МкАт-1 относятся к подклассу IgG1, а МкАт-2 и МкАт-3 – к подклассу IgG2b мыши. Исследование взаимодействия МкАт с рекомбинантным FliC в иммуноблоттинге показало, что МкАт-1 и МкАт-2 с абсолютной специфичностью

взаимодействовали с рекомбинантным белком FliC. МкАт-3 не выявлял FliC в данном типе анализа, что, возможно, связано с конформационными особенностями антигена. Для определения эпитопной направленности МкАт использовали «конкурентный» - вариант ИФА, для проведения которого получали конъюгаты с пероксидазой из корня хрена. По результатам конкурентного анализа показана высокая перекрёстная конкуренция (> 60 % подавления связывания) между МкАт-1 и МкАт-2, что указывало на их принадлежность к одному участку на молекуле рекомбинантного белка FliC.

Детекцию рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* и определение чувствительности проводили в «сэндвич» – варианте ИФА. При конструировании данного анализа использовали ПкАт и МкАт-2-ПХ (меченный пероксидазой из корня хрена). В предварительных опытах показана возможность детекции рекомбинантного белка FliC с чувствительностью 0,25 мкг/мл в «сэндвич» - варианте ИФА. Метод может быть использован в качестве стандартной процедуры для оценки выхода рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* на всех этапах его получения.

Таким образом, в ходе данной работы создан и запатентован штамм-продуцент рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa*. Разработан оригинальный метод очистки белка, изучены его иммунобиологические свойства и показана возможность создания иммуноферментного метода детекции рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* с использованием полученных моно/поликлональных антител.

Для подтверждения адьювантных свойств рекомбинантного белка FliC необходимо провести дальнейшие исследования его взаимодействия с другими антигенами. Это может включать в себя изучение различных комбинаций антигенов и модификаций рекомбинантного флагеллина для определения наилучшей стратегии иммунизации. Исследования должны также охватывать различные схемы введения вакцины и дозировки, чтобы выяснить, как эти факторы могут повлиять на выраженность иммунного ответа.

Кроме того, важно рассмотреть возможность применения других вспомогательных компонентов, которые могут синергически действовать с рекомбинантным белком FliC, усиливая его адъювантные свойства и обеспечивая более мощный иммунный ответ. Это актуально для разработки вакцин, которые смогут обеспечивать не только защиту от различных штаммов *P. aeruginosa*, но и высокую безопасность и переносимость для пациентов.

Дальнейшие исследования в этой области могут привести к созданию эффективных препаратов для профилактики инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, что имеет важное значение, особенно в контексте растущей устойчивости патогенов к традиционным методам лечения.

ВЫВОДЫ

1. Клонирована нуклеотидная последовательность гена *fliC*, кодирующая жгутиковый белок флагеллин *P. aeruginosa*, послужившая основой для создания штамма-продуцента *E. coli* с конструкцией pQE-30-FliC, при культивировании которого получен целевой продукт – рекомбинантный белок FliC *P. aeruginosa*.

2. Разработана методика очистки рекомбинантного белка FliC, состоящая из последовательных этапов: получение телец включения, удаление примесей с использованием буферных растворов мочевины и гуанидин гидрохлорида и диализа, позволившая выделить нетоксичный препарат с чистотой 97,6 %.

3. Установлено, что рекомбинантный белок FliC обладает защитными свойствами на модели экспериментальной синегнойной инфекции у мышей с индексом эффективности 3,0, а также проявляет адьювантную активность при сочетанном введении с поверхностным антигеном *K. pneumoniae*, обеспечивая индекс эффективности 6,1.

4. Выявлена способность сывороток мышей, иммунизированных рекомбинантным белком FliC *P. aeruginosa*, подавлять зону роста и био пленкообразование гомологичного штамма *in vitro*.

5. Получены три штамма гибридом, продуцирующих МкАт к одному участку на молекуле рекомбинантного белка FliC. Изучены их основные иммунохимические свойства, доказана принадлежность к классу IgG, а также специфичность связывания с рекомбинантным белком FliC в ИФА и иммуноблоттинге.

6. Показана возможность использования МкАт и ПкАт при конструировании тест-системы на основе ИФА для детекции рекомбинантного белка FliC.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученный штамм-продуцент обеспечивает стабильную экспрессию рекомбинантного белка FliC, что позволит стандартизировать и масштабировать процесс получения антигена с воспроизводимыми характеристиками.

Разработанный протокол очистки рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* обладает значительным потенциалом. Методологическая основа, заключающаяся в последовательной денатурации, солюбилизации из телец включения и ренатурации в щелочных условиях, может быть адаптирована для очистки широкого спектра других гидрофобных рекомбинантных белков, что делает метод перспективным для внедрения в стандартные биотехнологические процессы.

Разработанный ИФА на основе моно/поликлональных антител можно использовать в качестве стандартного метода для детекции рекомбинантного белка FliC на всех этапах биосинтеза и очистки.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В рамках дальнейших исследований, необходимо оценить перспективы использования и включения рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* в состав антисинегной рекомбинантной вакцины.

Представляет интерес дальнейшее изучение адьювантных свойств рекомбинантного белка FliC *P. aeruginosa* в отношении родственных и неродственных антигенов бактериальной и вирусной природы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

FliC – флагеллин

Kb – 1000 нуклеотидных пар

LB – среда Лурия-Бертани

SDS – додецилсульфат натрия

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан

АГ – антиген

БПО – биопленкообразование

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГАТ – культуральная среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин

ГТ – культуральная среда, содержащая гипоксантин и тимидин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИПТГ – изопропилтио- β -D-галактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

ИЭ – индекс эффективности защитных свойств

КББ – карбонатно-бикарбонатный буфер

КВ – система определения кворума

кДа – килодальтон

ЛД₅₀ – доза исследуемого агента, вызывающая летальный эффект у 50 % животных, взятых в опыт

ЛПС – липополисахарид

МкАт – моноклональные антитела

МкАт-ПХ – моноклональные антитела, конъюгированные пероксидазой хрена

н.п. – нуклеотидные пары

ОП – оптическая плотность

ПААГ – полиакриламидный гель

ПкАт – поликлональные антитела

ПСА – пиросульфат аммония

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин-N,N,N,N

ТМБ – 3,3', 5,5' тетраметилбензидин

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор

ЭПС – эндоплазматическая сеть

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абатуров, А. Е. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 4. Внутриклеточные сигнальные пути Tlr / А. Е. Абатуров, А. П. Волосовец, Е. И. Юлиш // Здоровье ребенка. – 2012. – № 8(43). – С. 163-167.
2. Ашмарин, И. П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев. – Ленинград : Медгиз, 1962. – 180 с.
3. Бесклеточная вакцина псевдомонас: иммунохимическая характеристика и иммуногенность / О. А. Бандман, Л. С. Едвабная, В. Ф. Булк [и др.] // Журнал микробиологии. – 1987. – № 11. – С. 44-47.
4. Биологическая характеристика и резистентность к дезинфектантам псевдомонад, выделенных от пациентов ожогового стационара / А. К. Мартусевич, Н. В. Абрамова, И. В. Бочарин [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022. – № 1-2(115). – С. 34-37. – DOI: 10.23670/IRJ.2022.115.1.046.
5. Биопленкообразование клиническими штаммами *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии ципрофлоксацина / И. В. Бабушкина, В. Ю. Ульянов, И. А. Мамонова, С. П. Шпиняк // Проблемы медицинской микологии. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 47.
6. Богомолова, Е. Г. Создание и характеристика иммуногена на основе белков VP6 и VP8 ротавируса группы А: специальность 03.01.04 «Биохимия»: диссертация ... кандидата биологических наук / Богомолова Елена Григорьевна; ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». – Санкт-Петербург, 2019. – 228 с.
7. Вертиев, Ю. В. Экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* и его роль в патогенезе синегнойной инфекции / Ю. В. Вертиев, Н. С. Бродвинова, А. Ф. Мороз // Журнал микробиологии. – 1981. – № 2. – С. 13-19.

8. Влияние антимикробных препаратов на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa* / У. М. Немченко, К. О. Ситникова, Н. Л. Белькова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26 – № 5. – С. 495-501. – DOI: 10.18699/VJGB-22-60.
9. Влияние порядка присоединения фрагментов HA2 и M2e вирусов гриппа А к флагеллину на свойства рекомбинантных белков / Л. А. Степанова, Р. Ю. Котляров, М. А. Шуклина [и др.] // ActaNaturae (русскоязычная версия). – 2018. – Т. 10 – № 1(36). – С. 90-100.
10. Гатыпова, Е. В. Получение рекомбинантного белка I наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и оценка его антигенных свойств / Е. В. Гатыпова, С. А. Злыгостев, А. А. Калошин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 6. – С. 50-53.
11. 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 ученой степени кандидата биологических наук / Гатыпова Екатерина Викторовна; Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН. – Москва, 2009. – 116 с.
12. Гибридный белок на основе второй субъединицы гемагглютинаина вирусов гриппа A/H2N2 формирует перекрестный иммунитет / Л. А. Степанова, М. В. Сергеева, М. А. Шуклина [и др.] // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2016. – Т. 8. – № 2(29). – С. 129-140.
13. Давыдова, О. К. Механизмы биопленкообразования у *Pseudomonas aeruginosa* / О. К. Давыдова, А. Н. Никиян, М. Д. Мороз // Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры : Материалы Всероссийской научно-методической конференции, Оренбург, 01–03 февраля 2024 года. – Оренбург: Оренбургский государственный университет, 2024. – С. 4811-4814.
14. Домнина, Н. А. Оценка аддитивного действия антибиотиков в комбинации с анти-QS на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa* / Н. А. Домнина //

Технологии живых систем. – 2024. – Т. 21. – № 2. – С. 76-81. – DOI: 10.18127/j20700997-202402-07.

15. Жеребцов, А. П. Исследование влияния моноклональных антител к рекомбинантному флагеллину на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, И. В. Яковлева, Н. А. Михайлова // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology* : Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 80-летию Великой Победы, Москва, 22–23 апреля 2025 года. – Москва: ООО "Издательство "Перо", 2025. – С. 14-15.

16. Жеребцов, А. П. Получение и исследование рекомбинантной формы флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, А. А. Калошин, Н. А. Михайлова // *Актуальная биотехнология*. – 2022. – № 1. – С. 86.

17. Жеребцов, А. П. Получение рекомбинантного флагеллина *Pseudomonas aeruginosa* и изучение его иммунобиологических свойств / А. П. Жеребцов, А. А. Калошин, Н. А. Михайлова // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2024 – 24(1). – С. 91-102. – DOI: 10.30895/2221-996X-2024-24-1-91-102.

18. Зверев, В. В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х томах. Том 2: учебное пособие для студентов учреждений высшего профессионального образования / В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 480.

19. Злыгостев, С. А. Получение рекомбинантного белка внешней мембраны OprF *Pseudomonas aeruginosa* и изучение его иммунобиологических свойств: специальность 03.00.07 «Микробиология», 03.00.15 «Генетика» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Злыгостев Сергей Александрович; Российский университет дружбы народов. – Москва, 2008. – 104 с.

20. Значение *Pseudomonas aeruginosa* в этиологии инфекционных осложнений у пациентов хирургического стационара / С. А. Свистунов, А. А. Кузин, Т. Н. Суборова, Д. А. Жарков // *Инфекция и иммунитет*. – 2017. – № 5. – С. 816.

21. Зубков, А. В. Изучение эпитопной структуры пероксидазы щитовидной железы человека : специальность 14.00.36. «Аллергология и иммунология» :

диссертация ... кандидата медицинских наук / Зубков Александр Владимирович; ГУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток РАМН». – Москва, 2007. – 221 с.

22. Изучение иммуногенности гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А / И. В. Духовлинов, Е. Г. Богомолова, Е. А. Федорова, А. С. Симбирцев // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 14 – № 2(81). – С. 96-101.

23. Иммуногенные свойства рекомбинантных белков, включающих эктодомен белка М2 вируса гриппа А / Л. А. Степанова, А. А. Ковалева, М. В. Потапчук [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 3. – С. 21-25.

24. Иммунологическая эффективность и безвредность в эксперименте пеоиммуногена – вакцины против инфекции *Pseudomonas aeruginosa* / Е. С. Станиславский, I. Joо, М. К. Северцова [и др.] // Журнал микробиологии. – 1982. – № 5. – С. 70-75.

25. Ирсимбетова, Н. Образование биоплёнки и резистентность к биоцидам у представителей семейства *Pseudomonadaceae* / Н. Ирсимбетова // Медицина Кыргызстана. – 2013. – № 8. – С. 63-65.

26. Исаева, Г. Ш. Биологические свойства и вирулентность *Helicobacter pylori* / Г. Ш. Исаева, Р. И. Валиева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20 – № 1. – С. 14-23.

27. Исаков, М. А. Получение рекомбинантных атоксичных форм экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* и изучение их иммунобиологических свойств: специальность 03.02.03 «Микробиология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Исаков Михаил Андреевич; Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН. – Москва, 2010. – 140 с.

28. Исследование иммуногенности и безопасности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного гибридного белка / Е. А. Варюшина, Г. В. Александров, М. С. Захаров [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2021. – Т. 21. – № 2. – С. 87-98. – DOI: 10.17816/MAJ71134.

29. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* / А. А. Калошин, Е. И. Леонова, А. В. Солдатенкова, Н. А. Михайлова // Вестник РАМН. – 2016. – № 71 (1). – С. 5-10.
30. Калиниченко, Е. О. Роль врожденного иммунитета человека в резистентности к *Pseudomonas aeruginosa*: основные механизмы / Е. О. Калиниченко, Е. В. Сорокина, В. Н. Столпникова // Медицинский вестник МВД. – 2024. – Т. 128. – № 1(128). – С. 86-91. – DOI: 10.52341/20738080.2023.128.1.86.
31. Калошин, А. А. Получение рекомбинантного гибридного белка OprF-aTox *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его протективных свойств / А. А. Калошин // Материалы Пермского научного форума. – 2015. – Т. 9(2). – С. 490-491.
32. Калошин А. А. Получение рекомбинантного гибридного белка OprF-aTox *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его протективных свойств / А. А. Калошин, Н. А. Михайлова, Е. И. Леонова // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18). – № 2. – С. 490-491.
33. Калошин, А. А. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств / А. А. Калошин, Е. В. Гатыпова, Н. А. Михайлова // Биотехнология. – 2011. – № 2. – С. 74-84.
34. Каталог ветеринарных препаратов: вакцина МИНКОВАК. – URL: <https://www.vetorg.ru/catalog/item-235.html>.
35. Кворум-сенсинг и коммуникация бактерий / И. А. Хмель, А. С. Белик, Ю. В. Зайцева, Н. Н. Данилова // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2008. – № 1. – С. 28-35.
36. Клиническое значение биопленкообразования у бактерий / Х. М. Галимзянов, О. А. Башкина, Э. Г. Досмуханова [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2018. – Т. 13. – № 4. – С. 32-42. – DOI: 10.17021/2018.13.4.32.42.

37. Колесова, Т. С. Этиологическая роль синегнойной палочки при различных оппортунистических и внутрибольничных инфекциях / Т. С. Колесова // Современная медицина: актуальные вопросы. – 2017. – № 3. – С. 134-140.
38. Лазарев, С. А. Исследование биологической активности метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus* : специальность 1.5.11. «Микробиология» : диссертация ... кандидата медицинских наук / Лазарев Сергей Александрович; Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2024. – 133 с.
39. Ленченко, Е. М. Популяционная изменчивость и патогенные свойства *Pseudomonas aeruginosa* / Е. М. Ленченко, Г. С. Толмачева, А. В. Моторыгин // Ветеринария. – 2017. – № 5. – С. 24-28.
40. Маниатис, Т. Методы генной инженерии / Т. Маниатис, Э. Френч, Дж. Сэмбрук // Молекулярное клонирование. – Москва, «Мир». – 1984.
41. Молекулярные системы регулирования формирования биопленок бактерий *Pseudomonas aeruginosa* / О. Ю. Манзенюк, В. В. Фирстова, Т. Н. Мухина, И. Г. Шемякин // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2018. – Т. 73. – № 4. – С. 244-251. – DOI: 10.15690/vramn1010.
42. Моррисон, А. В. Синегнойная инфекция: эффекты экзотоксина А / А. В. Моррисон, В. И. Попович, В. В. Моррисон // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2014. – Т. 10. – № 3. – С. 542-546.
43. Основные группы адъювантов и перспективы их использования для специфической профилактики особо опасных и других инфекционных болезней / А. В. Филиппенко, А. А. Труфанова, И. А. Иванова, Н. Д. Омельченко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2023. – Т. 100. – № 3. – С. 237-246. – DOI: 10.36233/0372-9311-339.
44. Патент № 1410527 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, С12Р 1/04. Способ получения экзотоксина А синегнойной палочки : № 4143068/13 : заявл. 10.09.1986 : опубл. 09.06.1995 / Н. А. Михайлова, Т. Н. Кузнецова, Ф. А. Шаймухаметов [и др.]; заявитель Уфимский научно-исследовательский

институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи // гугл ком: электронный справочник патентов России. – URL: <https://patents.google.com/patent/RU1410527C/ru> (дата обращения 06.04.2024).

45. Патент № 2793753 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/21, С12N 15/31, С12N 15/70. Рекомбинантная плазмидная ДНК PPA-FLICC, кодирующая синтез рекомбинантного флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa*, штамм *Escherichia coli* PA-FLICC – продуцент гибридного рекомбинантного белка и способ получения указанного белка : № 2022123813 : заявл. 07.09.2022 : опубл. 05.04.2023 / А. А. Калошин, А. П. Жеребцов, Н. А. Михайлова // гугл ком: электронный справочник патентов России URL: <https://patents.google.com/patent/RU2793753C1/ru> (дата обращения 05.04.2023).

46. Перспективные направления использования препаратов на основе рекомбинантного флагеллина / Г. А. Софронов, Е. В. Мурзина, В. Н. Болехан, О. М. Веселова, А. С. Симбирцев // Медицинский академический журнал. – 2017. – Т. 17(2). – С. 7-20.

47. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология : учебное пособие / О. К. Поздеев; под ред. В. И. Покровского. – 4-е изд., испр. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 768 с. – ISBN 978-5-9704-1530-6.

48. Получение и изучение свойств поливалентной корпускулярной синегнойной вакцины / Т. И. Титова, Т. Н. Сидорова, С. А. Радкевич [и др.] // Журнал микробиологии. – 1985. – № 8. – С. 80-84.

49. Получение моноклональных антител для выявления рекомбинантного флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, И. В. Яковлева, Н. Ф. Гаврилова, Н. А. Михайлова // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 23–24 апреля 2024 года. – Москва: ООО "Издательство "Перо", 2024. – С. 18-19.

50. Получение моноклональных антител для детекции рекомбинантного флагеллина С *Pseudomonas aeruginosa* / А. П. Жеребцов, И. В. Яковлева,

- Н. Ф. Гаврилова, Н. А. Михайлова // Инфекция и иммунитет. – 2024. – Т. 14. – № 3. – С. 551-556. – DOI: 10.15789/2220-7619-РОМ-16865.
51. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* / А. А. Калошин, М. А. Исаков, Н. А. Михайлова, Ю. В. Вертиев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – № 154 (9). – С. 330-335.
52. Получение слитых рекомбинантных белков OprF- Δ OprI, Δ OprF- Δ OprI и OprF- α Tox- Δ OprI *Pseudomonas aeruginosa* / А. А. Калошин, А. В. Солдатенкова, Е. М. Зимица, Н. А. Михайлова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 5. – С. 32-38. – DOI: 10.36233/0372-9311-2017-5-32-38.
53. Противолучевая эффективность флагеллина в опытах на мышах / Н. И. Лисина, Р. А. Щеголева, Т. Г. Шлякова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2019. – Т. 59. – № 3. – С. 274-278. – DOI: 10.1134/S086980311903007X.
54. Псевдовак (Pseudovac): уникальная поливалентная вакцина для профилактики и терапии синегнойной инфекции - теперь и в России // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – № 13. – С. 8-11.
55. Руднов, В. А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций вызванных *P. aeruginosa* / В. А. Руднов // Русский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13(7). – С. 485-490.
56. Семакова, А. П. Адьювантные технологии в создании современных вакцин / А. П. Семакова, Н. И. Микшиц // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 28-35. – DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-28-35.
57. Синегнойная палочка в РФ: история одного из наиболее успешных нозокомиальных патогенов / Е. Ю. Скленова, И. С. Азизов, Е. А. Шек [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20. – № 3. – С. 164-171.

58. Синегнойная палочка: патогенность, патогенезипатология / А. В. Лазарева, И. В. Чеботарь, О. А. Крыжановская [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17. – № 3. – С. 170-186.
59. Синегнойная палочка: характеристика биопленочного процесса / А. Н. Маянский, И. В. Чеботарь, Е. И. Руднева, В. П. Чистякова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2012. – № 1. – С. 3-8.
60. Современные подходы к введению показателя «Аномальная токсичность» / Н. П. Неугодова, Е. О. Степанюк, Г. А. Сапожникова [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2020. – Т. 10. – № 2. – С. 82-88. – DOI: 10.30895/1991-2919-2020-10-2-82-88.
61. Солдатенкова, А. В. Моноклональные антитела для выявления нативного и рекомбинантного экзотоксина *A Pseudomonas aeruginosa*: специальность 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Солдатенкова Алёна Владимировна; Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН. – Москва, 2016. – 123 с.
62. Университетская библиотека ONLINE : официальный сайт. – URL: https://biblioclub.ru/index.php?page=book_red&id=45590.
63. Хайтович, А. Б. Чувство кворума микроорганизмов как фактор патогенности / А. Б. Хайтович, Е. А. Мурейко // Таврический медико-биологический вестник. – 2018. – Т. 21. – № 1. – С. 206-212.
64. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований : Учебное пособие для СПО / А. С. Лабинская, А. С. Анкирская, М. В. Бадлеева [и др.]. – 3-е издание, стереотипное. – Санкт-Петербург : Издательство "Лань", 2020. – 608 с.
65. Чеботарь, И. В. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция / И. В. Чеботарь, Ю. А. Бочарова, Н. А. Маянский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19. – № 4. – С. 308-319.

66. Эпидемиологические аспекты нозокомиальной синегнойной инфекции в многопрофильном хирургическом стационаре / Т. И. Карпунина, М. В. Кузнецова, Н. В. Николаева, В. А. Демаков. // Сибирский медицинский журнал. – 2009 – Т. 24. – № 4-1. – С. 70-73.
67. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli* / W. T. Chan, C. S. Verma, D. P. Lane, S. K. E Gan // Bioscience Reports. – 2013. – Vol. 33(6). – P. e00086. – DOI: 10.1042/BSR20130098.
68. A flagellin-conjugate protein induces dual NLRC4- and NLRP3-inflammasome activation which modulates inflammatory cytokine secretion from macrophages / Y. J. Lin, A. Jamin, S. Wolfheimer [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2023. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.1136669.
69. A phase I safety and immunogenicity dose escalation trial of plague vaccine, Flagellin/F1/V, in healthy adult volunteers (DMID 08-0066) / S. E. Frey, K. Lottenbach, I. Graham [et al.] // Vaccine. – 2017. – Vol. 35. – № 48 Pt B. – P. 6759-6765. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.070.
70. A scalable method for biochemical purification of *Salmonella* flagellin / R. Simon, B. Curtis, V. Deumic [et al.] // Protein Expression and Purification. – 2014. – Vol. 102. – P 1-7. – DOI: 10.1016/j.pep.2014.07.005.
71. A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity / W. F. McDonald, J. W. Huleatt, H. G. Foellmer [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 195. – № 11. – P. 1607-1617. – DOI: 10.1086/517613.
72. AiiM Lactonase Strongly Reduces Quorum Sensing Controlled Virulence Factors in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burned Patients / L. E. López-Jácome, G. Garza-Ramos, M. Hernández-Durán [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 14. – № 10. – P. 2657. – DOI: 10.3389/fmicb.2019.02657.
73. Akahoshi, D. T. Flagella at the Host-Microbe Interface: Key Functions Intersect With Redundant Responses / D. T. Akahoshi, C. L. Bevins // Frontiers in Immunology. – 2022. – Vol. 13. – P. 828758. – DOI: 10.3389/fimmu.2022.828758.
74. Al-Anssari, M. J. Partial purification of type A and B flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* for preclinical use / M. J. Al-Anssari, A. H. Al-Charrakh // International

Journal of Health Sciences. – 2022. – Vol. 6(S1). – P. 3661-3670. – DOI: 10.53730/ijhs.v6nS1.5590.

75. Alexandre, G. Chemotaxis Control of Transient Cell Aggregation / G. Alexandre // Journal of Bacteriology. – 2015. – Vol. 197. – № 20. – P. 3230-3237. – DOI: 10.1128/JB.00121-15.

76. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models / L. G. Burdelya, V. I. Krivokrysenko, T. C. Tallant [et al.] // Science. – 2008. – Vol. 320. – № 5873. – P. 226-230. – DOI: 10.1126/science.1154986.

77. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies / Z. Pang, R. Raudonis, B. R. Glick [et al.] // Biotechnology Advances. – 2019. – Vol. 37. – № 1. – P. 177-192. – DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.

78. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies / A. Elfadadny, R. F. Ragab, M. AlHarbi [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1374466. – DOI: 10.3389/fmicb.2024.1374466.

79. Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments / S. Singh, S. Datta, K. B. Narayanan [et al.] // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2021 – Vol. 19. – № 1. – P. 140. – DOI: 10.1186/s43141-021-00242-y.

80. Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms / Y. Rossez, E. B. Wolfson, A. Holmes [et al.] // PLOS Pathogens. – 2015. – Vol. 11. – № 1. – P. e1004483. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1004483.

81. Bacterial flagellin – a potent immunomodulatory agent / I. Hajam, P. Dar, I. Shahnawaz [et al.] // Exp Mol Med. – 2017. – Vol. 49. – P. e373. – DOI: 10.1038/emm.2017.172.

82. Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control / C. Johnston, B. Martin, G. Fichant [et al.] // Nature Reviews Microbiology. – 2014. – Vol. 12. – P. 181-196. – DOI: 10.1038/nrmicro3199.

83. Ben-Yedidia, T. Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine / T. Ben-Yedidia, R. Arnon // *Immunology Letters*. – 1998. – Vol. 64. – № 1. – P. 9-15. – DOI: 10.1016/s0165-2478(98)00073-x.
84. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl / M. J. Franklin, D. E. Nivens, J. T. Weadge, P. L. Howell // *Frontiers in Microbiology*. – 2011. – Vol. 2. – P. 167. – DOI: 10.3389/fmicb.2011.00167.
85. Both radioresistant and hemopoietic cells promote innate and adaptive immune responses to flagellin / C. J. Sanders, D. A. Moore, I. R. Williams [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180. – № 11. – P. 7184-7192. – DOI: 10.4049/jimmunol.180.11.7184.
86. Burnham, P. M. A Polar Flagellar Transcriptional Program Mediated by Diverse Two-Component Signal Transduction Systems and Basal Flagellar Proteins Is Broadly Conserved in Polar Flagellates / P. M. Burnham, W. P. Kolar, D. R. Hendrixson // *mBio*. – 2020. – Vol. 11. – № 2. – P. e03107-e03119. – DOI: 10.1128/mBio.03107-19.
87. Carroll, B. L. Structural Conservation and Adaptation of the Bacterial Flagella Motor / B. L. Carroll, J. Liu // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – № 11. – P. 1492. – DOI: 10.3390/biom10111492.
88. CD8+ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein / C. J. Braga, L. M. Massis, M. E. Sbrogio-Almeida [et al.] // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – № 5. – P. 1373-1382. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.11.003.
89. Chang, Y. Structural basis of bacterial flagellar motor rotation and switching / Y. Chang, B. L. Carroll, J. Liu // *Trends in Microbiology*. 2021. – Vol. 29. – № 11. – P. 1024-1033. – DOI: 10.1016/j.tim.2021.03.009.
90. Coffman, R. L. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work / R. L. Coffman, A. Sher, R. A. Seder // *Immunity*. – 2010. – Vol. 33. – № 4. – P. 492-503. – DOI: 10.1016/j.immuni.2010.10.002.
91. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin / K. L. Lightfield, J. Persson, S. W. Brubaker [et al.] // *Nature Immunology*. – 2008. – Vol. 9. – № 10. – P. 1171-1178. – DOI: 10.1038/ni.1646.

92. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf / E. A. Miao, C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors [et al.] // *Nature Immunology*. – 2006. – Vol. 7. – № 6. – P. 569-575. – DOI: 10.1038/ni1344.
93. Deimmunization of flagellin adjuvant for clinical application / J. H. Rhee, K. Khim, S. Puth, Y. Choi [et al.] // *Current opinion in virology*. – 2023. – Vol. 60. – P. 101330. – DOI: 10.1016/j.coviro.2023.101330.
94. Dependent- σ^{28} small RNA regulation of flagella biosynthesis / S. Melamed, A. Zhang, M. Jarnik, J. Mills [et al.] // *Elife*. – 2023. – Vol. 12. – P. RP87151. – DOI: 10.7554/eLife.87151.
95. Different serotypes of *Escherichia coli* flagellin exert identical adjuvant effects / S. Pang, W. Wu, Q. Liu [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2022. – Vol. 18. – № 1. – P. 308. – DOI: 10.1186/s12917-022-03412-3.
96. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells / G. Caron, D. Duluc, I. Frémaux [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2005. – Vol. 175. – № 3. – P. 1551-1557.
97. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis / E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 18. – № 3. – P. 318-327.
98. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili / E. J. van Schaik, C. L. Giltner, G. F. Audette [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2005. – Vol. 187. – № 4. – P. 1455-1464. – DOI: 10.1128/JB.187.4.1455-1464.2005.
99. Douglas, C. M. Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa*: substitution of glutamic acid 553 with aspartic acid drastically reduces toxicity and enzymatic activity / C. M. Douglas, R. J. Collier // *Journal of Bacteriology*. – 1987. – Vol. 169. – № 11. – P. 4967-4971.
100. Efficacy of a *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O9 vaccine / D. A. Moustafa, A. DiGiandomenico, V. Raghuram [et al.] // *Journal of Infection and Immunity*. – 2023. – Vol. 91. – № 12. – P. e0024723. – DOI: 10.1128/iai.00247-23.

101. Enhanced immunogenicity elicited by a novel DNA vaccine encoding the SARS-CoV-2 S1 protein fused to the optimized flagellin of *Salmonella typhimurium* in mice / L. Song, Q. Wang, Y. Wen [et al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2023. – Vol. 11. – № 6. – P. e0254923. – DOI: 10.1128/spectrum.02549-23.
102. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections / J. P. Horcajada, M. Montero, A. Oliver [et al.] // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2019. – Vol. 32. – № 4. – P. e00031-e00019.
103. Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells / T. Tallant, A. Deb, N. Kar [et al.] // *BMC Microbiology*. – 2004 – Vol. 23. – № 4. – P. 33. – DOI: 10.1186/1471-2180-4-33.
104. Flagellin as a vaccine adjuvant / B. Cui, X. Liu, Y. Fang [et al.] // *Expert Review of Vaccines*. – 2018. – Vol. 17. – № 4. – P. 335-349. – DOI: 10.1080/14760584.2018.1457443.
105. Flagellin enhances saliva IgA response and protection of anti-caries DNA vaccine / W. Shi, Y. H. Li, F. Liu [et al.] // *J Dent Res*. – 2012. – Vol. 91. – № 3. – P. 249-254. – DOI: 10.1177/0022034511424283.
106. Flagellin influences the expression of a variety of important cytokines and chemokines without affecting the immune status of umbilical cord mesenchymal stem cells / Q. Li, Y. Ma, L. Li [et al.] // *Mol Med Rep*. – 2015. – Vol. 12. – № 5. – P. 6955-6961. – DOI: 10.3892/mmr.2015.4276.
107. Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4+ T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection / R. G. Labastida-Conde, O. Ramírez-Pliego, M. Peleteiro-Olmedo [et al.] // *Vaccine*. – 2018. – Vol. 36. – № 29. – P. 4188-4197. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.06.005.
108. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis* / A. N. Honko, N. Sriranganathan, C. J. Lees, S. B. Mizel // *Infect Immun*. – 2006. – Vol. 74. – № 2. – P. 1113-1120. – DOI: 10.1128/IAI.74.2.1113-1120.2006.

109. Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses a subtypes / L. A. Stepanova, E. S. Mardanova, M. A. Shuklina [et al.] // *J Biomed Sci.* – 2018. – Vol. 25. – № 1. – P. 33. – DOI: 10.1186/s12929-018-0433-5.
110. Flagellin/NLRC4 Pathway Rescues NLRP3-Inflammasome Defect in Dendritic Cells From HIV-Infected Patients: Perspective for New Adjuvant in Immunocompromised Individuals / E. C. Dos Reis, V. N. C. Leal, J. L. D. S. Soares [et al.] // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1291. – DOI: 10.3389/fimmu.2019.01291.
111. Flagellin-PAc fusion protein is a high-efficacy anti-caries mucosal vaccine / Y. Sun, W. Shi, J. Y. Yang [et al.] // *J Dent Res.* – 2012. – Vol. 91. – № 10. – P. 941-947. – DOI: 10.1177/0022034512457684.
112. Gambino, M. Flagellotropic phages: common yet diverse host interaction strategies / M. Gambino, M. C. H. Sørensen // *Curr Opin Microbiol.* – 2024. – Vol. 78. – P. 102451. – DOI: 10.1016/j.mib.2024.102451.
113. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa* / T. de Sousa, M. Hébraud, M.L.N.E. Dapkevicius [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – № 23. – P. 12892.
114. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *Lancet (London, England).* – 2022. – Vol. 399. – № 10325. – P. 629-655.
115. Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking in vivo / E. Holmqvist, P. R. Wright, L. Li [et al.] // *EMBO.* – 2016. – 35. – P. 991-1011. – DOI: 10.15252/embo.201593360.
116. Grognot, M. More than propellers: how flagella shape bacterial motility behaviors / M. Grognot, K. M. Taute // *Curr Opin Microbiol.* – 2021. – Vol. 61. – P. 73-81. – DOI: 10.1016/j.mib.2021.02.005.
117. Hershberg, R. Co-evolution of transcription factors and their targets depends on mode of regulation / R. Hershberg, H. Margalit // *Genome Biol.* – 2006. – Vol. 7. – № 7. – P. R62. – DOI: 10.1186/gb-2006-7-7-r62.

118. Hfq-Assisted RsmA Regulation Is Central to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Polysaccharide PEL Expression / Y. Irie, A. La Mensa, V. Murina [et al.] // *Front Microbiol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 482585. – DOI: 10.3389/fmicb.2020.482585.
119. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells / N. K. Crellin, R. V. Garcia, O. Hadisfar [et al.] // *J Immunol.* – 2005. – Vol. 175. – № 12. – P. 8051-8059. – DOI: 10.4049/jimmunol.175.12.8051.
120. Immunologicheskaja éffektivnost' i bezvrednost' v éksperimente pioimmunogena-vaktsiny protiv infektsii *Pseudomonas aeruginosa* [Experimental immunological effectiveness and safety of pyoimmunogen vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection] / E. S. Stanislavskiĭ, I. Ioo, M. K. Severtsova [et al.] // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* – 1982. – № 5. – P. 70-75.
121. Improved vectors for retron-mediated CRISPR-Cas9 genome editing in *Saccharomyces cerevisiae* / T. N. Stuecker, S. E. Hood, J. M. Pineda [et al.] // *bioRxiv* [Preprint]. – 2024. – Vol. 7. – P. 2024.08.06.606807. – DOI: 10.1101/2024.08.06.606807.
122. Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses / B. Z. Wang, F. S. Quan, S. M. Kang [et al.] // *J Virol.* – 2008. – Vol. 82. – № 23. – P. 11813-11823. – DOI: 10.1128/JVI.01076-08.
123. Incorporation of membrane-anchored flagellin or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit enhances the immunogenicity of rabies virus-like particles in mice and dogs / Y. Qi, H. Kang, X. Zheng [et al.] // *Front Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 169. – DOI: 10.3389/fmicb.2015.00169.
124. Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI) / D. N. Taylor, J. J. Treanor, C. Strout [et al.] // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29. – № 31. – P. 4897-4902. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.001.
125. Investigation of inflammatory responses of pulmonary microvascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide and mechanism / S. F. Xu, P. Wang, Z. X. Liang [et al.] // In Chinese. – 2011. – Vol. 34. – № 11. – P. 816-820.

126. Isolation of the autoinducer-quenching strain that Inhibits LasR in *Pseudomonas aeruginosa* / L. Weng, Y. Zhang, Y. Yang, L. Wang // Intern J Molecular Sciences. – 2014. – Vol. 15. – № 4. – P. 6328-6342.
127. Jurado-Martín, I. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors / I. Jurado-Martín, M. Sainz-Mejías, S. McClean // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22. – № 6. – P. 3128. – DOI: 10.3390/ijms22063128.
128. Killough, M. *Pseudomonas aeruginosa*: Recent Advances in Vaccine Development / M. Killough, A. M. Rodgers, R. J. Ingram // Vaccines (Basel). – 2022. – Vol. 10. – № 7. – P. 1100. – DOI: 10.3390/vaccines10071100.
129. Lu, Y. Functional properties of flagellin as a stimulator of innate immunity / Y. Lu, J. R. Swartz // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 18379. – DOI: 10.1038/srep18379.
130. Ma, Y. U. Expression levels of cytokines and chemokines increase in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by activation of the Toll-like receptor 5 pathway / Y. U. Ma, L. I. Zhang, Q. Li // Exp Ther Med. – 2016. – Vol. 11. – № 2. – P. 588-592. – DOI: 10.3892/etm.2015.2914.
131. Main Metabolites of *Pseudomonas aeruginosa*: A Study of Electrochemical Properties / S. Schneider, J. Ettenauer, I. J. Pap [et al.] // Sensors (Basel). – 2022. – Vol. 22. – № 13. – P. 4694. – DOI: 10.3390/s22134694.
132. Malaria Vaccine Development: Are Bacterial Flagellin Fusion Proteins the Bridge between Mouse and Humans / D. Y. Bargieri, I. S. Soares, F. T. Costa [et al.] // J Parasitol Res. – 2011. – Vol. 2011. – P. 965369. – DOI: 10.1155/2011/965369.
133. Mazor, R. Immunogenicity of Immunotoxins Containing *Pseudomona* Exotoxin A: Causes, Consequences, and Mitigation / R. Mazor, I. Pastan // Front Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 1261. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.01261.
134. McCarron, M. Activated human neonatal CD8+ T cells are subject to immunomodulation by direct TLR2 or TLR5 stimulation / M. McCarron, D. J. Reen // J Immunol. – 2009. – Vol. 182. – № 1. – P. 55-62. – DOI: 10.4049/jimmunol.182.1.55.
135. Merrell, D. S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis / D. S. Merrell, S. Falkow // Nature. – 2004. – Vol. 430. – P. 250-256.

136. Michel, G. P. The type II secretory system (T2SS) in Gram-negative bacteria: a molecular nanomachine for secretion of Sec and Tat-dependent extracellular proteins. In: Wooldridge KG (ed) Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis / G. P. Michel, R. Voulhoux. – Caister: Norfolk, 2009. – P. 67-92.
137. Michel-Briand, Y. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Michel-Briand, C. Baysse // Biochimie. – 2002. – Vol. 84. – № 5-6. – P. 499-510. – DOI: 10.1016/s0300-9084(02)01422-0.
138. Migration and accumulation of bacteria with chemotaxis and chemokinesis / T. Jakuszeit, J. Lindsey-Jones, F. J. Peaudecerf, O. A. Croze // Eur Phys J E Soft Matter. – 2021. – Vol. 44. – № 3. – P. 32. – DOI: 10.1140/epje/s10189-021-00009-w.
139. Minamino, T. Structure, Assembly, and Function of Flagella Responsible for Bacterial Locomotion / T. Minamino, M. Kinoshita // EcoSal Plus. – 2023. – Vol. 11. – № 1. – P. eesp00112023. – DOI: 10.1128/ecosalplus.esp-0011-2023.
140. Mizel, S. B. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential / S. B. Mizel, J. T. Bates // J Immunol. – 2010. – Vol. 185. – № 10. – P. 5677-5682. – DOI: 10.4049/jimmunol.1002156.
141. Mizel, S. B. Identification of a sequence in human toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin / S. B. Mizel, A. P. West, R. R. Hantgan // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278. – № 26. – P. 23624-23629. – DOI: 10.1074/jbc.M303481200.
142. Moens, S. Functions of bacterial flagella / S. Moens, J. Vanderleyden // Crit Rev Microbiol. – 1996. – Vol. 22. – № 2. – P. 67-100. – DOI: 10.3109/10408419609106456.
143. Moors, M. A. Activation of interleukin-1 receptor-associated kinase by gram-negative flagellin / M. A. Moors, L. Li, S. B. Mizel // Infect Immun. – 2001. – Vol. 69. – № 7. – P. 4424-4429. – DOI: 10.1128/IAI.69.7.4424-4429.2001.
144. Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice / J. T. Bates, A. N. Honko, A. H. Graff [et al.] // Mech Ageing Dev. – 2008. – Vol. 129. – № 5. – P. 271-281. – DOI: 10.1016/j.mad.2008.01.009.
145. Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology / R. Colin, B. Ni, L. Laganenka, V. Sourjik // FEMS Microbiol Rev. – 2021. – Vol. 45. – № 6. – P. fuab038. – DOI: 10.1093/femsre/fuab038.

146. Nakamura, S. Flagella-Driven Motility of Bacteria / S. Nakamura, T. Minamino // *Biomolecules*. – 2019. – Vol. 9. – № 7. – P. 279. – DOI: 10.3390/biom9070279.
147. Nakane, K. P. Peroxidase – labeled antibody a new method of conjugation / K. P. Nakane, A. Kawaoi // *J. Histochem Cytochem*. – 1974. – Vol. 22. – № 12. – P. 1081-1091.
148. Nedeljković, M. Bacterial flagellar filament: a supramolecular multifunctional nanostructure / M. Nedeljković, D. E. Sastre, E. J. Sundberg // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22. – № 14. – P. 7521.
149. *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology* : Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 03–04 июня 2022 года / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: Издательство "Перо", 2022. – 34 p. – ISBN 978-5-00204-550-1.
150. NFκB- and MAP-Kinase Signaling Contribute to the Activation of Murine Myeloid Dendritic Cells by a Flagellin A:Allergen Fusion Protein / T. Moeller, S. Wolfheimer, A. Goretzki [et al.] // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – № 4. – P. 355. – DOI: 10.3390/cells8040355.
151. Optimal long peptide for flagellin-adjuvanted HPV E7 cancer vaccine to enhance tumor suppression in combination with anti-PD-1 / H. H. Lee, S. H. Hong, J. H. Rhee, S. E. Lee // *Transl Cancer Res*. – 2022. – 11. – № 6. – P. 1595-1602. – DOI: 10.21037/tcr-21-2798.
152. O'Toole, G. A. Biofilm formation as microbial development / G. A. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter // *The Annual Review of Microbiology*. – 1999. – № 54. – P. 49-79.
153. Parkins, M. D. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis / M. D. Parkins, R. Somayaji, V. J. Waters // *Clin Microbiol Rev*. – 2018. – Vol. 31. – № 4. – P. e00019-18. – DOI: 10.1128/cmr.00019-18.
154. Pasare, C. Control of B-cell responses by Toll-like receptors / C. Pasare, R. Medzhitov // *Nature*. – 2005. – Vol. 438. – № 7066. – P. 364-368. – DOI: 10.1038/nature04267.

155. Pessi, G. Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes hcnABC by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa* / G. Pessi, D. Haas // J Bacteriol. – 2000. – Vol. 182. – № 24. – P. 6940-6949. – DOI: 10.1128/JB.182.24.6940-6949.
156. Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / K. T. Schiessl, F. Hu, J. Jo [et al.] // Nat Commun. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 762. – DOI: 10.1038/s41467-019-08733-w.
157. Pina-Sánchez, M. Present and future of resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for treatment / M. Pina-Sánchez, M. Rua, J. L. Del Pozo // Rev Esp Quimioter. – 2023. – Vol. 36. – Suppl 1. – P. 54-58. – DOI: 10.37201/req/s01.13.2023.
158. Pitt, T. L. Preparation of agglutinating antisera specific for the flagellar antigens of *Pseudomonas aeruginosa* / T. L. Pitt // J Med Microbiol. – 1981. – Vol. 14. – № 3. – P. 251-260. – DOI: 10.1099/00222615-14-3-251.
159. Protective Immunity and Reduced Renal Colonization Induced by Vaccines Containing Recombinant *Leptospira interrogans* Outer Membrane Proteins and Flagellin Adjuvant / D. Monaris, M. E. Sbrogio-Almeida, C. C. Dib [et al.] // Clin Vaccine Immunol. – 2015. – Vol. 22. – № 8. – P. 965-973. – DOI: 10.1128/CVI.00285-15.
160. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons / S. Bleves, V. Viarre, R. Salacha [et al.] // Int J Med Microbiol – 2010. – Vol. 300. – P. 534-543.
161. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология / А. В. Лазарева, И. В. Чеботарь, О. А. Крыжановская [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17. – № 3. – С. 170-186.
162. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics / S. Qin, W. Xiao, C. Zhou [et al.] // Signal Transduct Target Ther. – 2022. – Vol. 7. – № 1. – P. 199. – DOI: 10.1038/s41392-022-01056-1.
163. *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities / A. A. Abdelaziz, A. M. A. Kamer, K. B. Al-Monofy, L. A. Al-

Madboly // *Microb Cell Fact.* – 2023. – Vol. 22. – № 1. – P. 110. – DOI: 10.1186/s12934-023-02122-1.

164. *Pseudomonas chemotaxis* / I. Sampedro, R. E. Parales, T. Krell, J. E. Hill // *FEMS Microbiol Rev.* – 2015. – Vol. 39. – № 1. – P. 17-46. – DOI: 10.1111/1574-6976.12081.

165. *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities / M. Bouteiller, C. Dupont, Y. Bourigault [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – № 7. – P. 3337. – DOI: 10.3390/ijms22073337.

166. Pyocyanin-induced toxicity in A549 respiratory cells is causally linked to oxidative stress / L. S. Gloyne, G. D. Grant, A. V. Perkins [et al.] // *Toxicol In Vitro.* – 2011. – Vol. 25. – № 7. – P. 1353-1358. – DOI: 10.1016/j.tiv.2011.05.004.

167. Rapid CD4+ T-cell responses to bacterial flagellin require dendritic cell expression of Syk and CARD9 / S. M. Atif, S.J. Lee, L. X. Li [et al.] // *Eur J Immunol.* – 2015. – Vol. 45. – № 2. – P. 513-524. – DOI: 10.1002/eji.201444744.

168. Salman, H. H. Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination / H. H. Salman, J. M. Irache, C. Gamazo // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27. – № 35. – P. 4784-4790. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.05.091.

169. *Salmonella* flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line / F. Ciacci-Woolwine, I. C. Blomfield, S. H. Richardson, S. B. Mizel // *Infect. Immun.* – 1998. – Vol. 66. – P. 1127-1134.

170. Sharma, D. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities / D. Sharma, L. Misba, A. U. Khan // *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019. – Vol. 8. – P. 76. – DOI: 10.1186/s13756-019-0533-3.

171. Singh, V. K. Entolimod as a radiation countermeasure for acute radiation syndrome / V. K. Singh, T. M. Seed // *Drug Discov Today.* – 2021. – Vol. 26. – № 1. – P. 17-30. – DOI: 10.1016/j.drudis.2020.10.003.

172. Song, W. S. Crystal structure of FliC flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* and its implication in TLR5 binding and formation of the flagellar filament / W. S. Song, S. I. Yoon // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2014. – Vol. 444. – № 2. – P. 109-115. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.008.

173. Stanislavsky, E. S. *Pseudomonas aeruginosa* antigens as potential vaccines / E. S. Stanislavsky, J. S. Lam // FEMS Microbiol Rev. – 1997. – Vol. 21. – № 3. – P. 243-277. – DOI: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00353.x.
174. Structural basis of assembly and torque transmission of the bacterial flagellar motor / J. Tan, X. Zhang, X. Wang [et al.] // Cell. – 2021. – Vol. 184. – № 10. – P. 2665-2679.e19. – DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.057.
175. Structural biology of bacterial secretion systems in Gram-negative pathogens – potential for new drug targets / E. Durand, D. Verger, A. T. Rêgo [et al.] // Infect Disord Drug Targets. – 2009. – Vol. 9. – P. 518-547.
176. Structure of the molecular bushing of the bacterial flagellar motor / T. Yamaguchi, F. Makino, T. Miyata [et al.] // Nat. Commun. – 2021. – Vol. 12. – P. 4469. – DOI: 10.1038/s41467-021-24715-3.
177. Subramanian, S. Functional Regulators of Bacterial Flagella / S. Subramanian, D. B. Kearns // Annu Rev Microbiol. – 2019. – Vol. 73. – P. 225-246. – DOI: 10.1146/annurev-micro-020518-115725.
178. Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors / T. H. Jakobsen, T. Bjarnsholt, P. O. Jensen [et al.] // Future microbiology. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – P. 901-921.
179. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides / R. Follador, E. Heinz, K. L. Wyres [et al.] // Microb Genom. – 2016. – Vol. 2. – № 8. – P. e000073. – DOI: 10.1099/mgen.0.000073.
180. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5 / F. Hayashi, K. D. Smith, A. Ozinsky [et al.] // Nature. – 2001. – Vol. 410. – № 6832. – P. 1099-1103. – DOI: 10.1038/35074106.
181. The Landscape of *Pseudomonas aeruginosa* Membrane-Associated Proteins / S. Motta, D. Vecchiotti, A. M. Martorana [et al.] // Cells. – 2020. – Vol. 9. – № 11. – P. 2421. – DOI: 10.3390/cells9112421.
182. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* / P. N. Jimenez, G. Koch, J. A. Thompson [et al.] // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2012. – Vol. 76. – № 1. – P. 46-65.

183. The role of the C-terminal D0 domain of flagellin in activation of Toll like receptor 5 / V. Forstnerič, K. Ivičak-Kocjan, T. Plaper [et al.] // PLoS Pathog. – 2017. – Vol. 13. – № 8. – P. e1006574. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1006574.
184. Thi, M. T. T. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms / M. T. T. Thi, D. Wibowo, B. H. A. Rehm // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21. – № 22. – P. 8671. – DOI: 10.3390/ijms21228671.
185. Toll-like receptor 5-mediated signaling enhances liver regeneration in mice / W. Zhang, L. Wang, X. H. Sun [et al.] // Mil Med Res. – 2021. – Vol. 8. – № 1. – P. 16. – DOI: 10.1186/s40779-021-00309-4.
186. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility / K. D. Smith, E. Andersen-Nissen, F. Hayashi [et al.] // Nat Immunol. – 2003. – Vol. 4. – № 12. – P. 1247-1253. – DOI: 10.1038/ni1011.
187. Trends in *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) Bacteremia during the COVID-19 Pandemic: A Systematic Review / Q. X. Ng, N. Y. Ong, D. Y. X. Lee [et al.] // Antibiotics. – 2023. – Vol. 12. – № 2. – P. 409. – DOI: 10.3390/antibiotics12020409.
188. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity / J. W. Huleatt, A. R. Jacobs, J. Tang [et al.] // Vaccine. – 2007. – Vol. 25. – № 4. – P. 763775. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.08.013.
189. Vaccine adjuvants: current status, research and development, licensing, and future opportunities / Y. Cui, M. Ho, Y. Hu, Y. Shi // J Mater Chem B. – 2024. – Vol. 12. – № 17. – P. 4118-4137. – DOI: 10.1039/d3tb02861e.
190. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms / T. Zhao, Y. Cai, Y. Jiang [et al.] // Signal Transduct Target Ther. – 2023. – Vol. 8. – № 1. – P. 283. – DOI: 10.1038/s41392-023-01557-7.
191. Wadhwa, N. Bacterial motility: machinery and mechanisms / N. Wadhwa, H. C. Berg // Nat. Rev. Microbiol. – 2021. – Vol. 20. – P. 1-6. – DOI: 10.1074/jbc.C112.378380.

192. Waters, C. M. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria / C. M. Waters, B. L. Bassler // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2005. – Vol. 21. – P. 319-346. – DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.
193. Zhao, A. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies / A. Zhao, J. Sun, Y. Liu // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2023. – Vol. 13. – P. 1137947. – DOI: 10.3389/fcimb.2023.1137947.