

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАКТОБАЦИЛЛ В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТОВ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ХИМЕРНОЙ ПНЕВМОКОККОВОЙ ВАКЦИНОЙ

Леонтьева Г.Ф.¹, Крамская Т.А.¹, Грабовская К.Б.¹,
Филимонова В.Ю.¹, Лайно Д.², Виллена Д.², Альварес С.²,
Даниленко В.Н.³, Суворов А.Н.^{1,4}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Референсный центр по исследованию лактобацилл, Тукуман, Аргентина

³ ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Одной из наиболее актуальных задач медико-биологической науки является создание вакцинных препаратов против патогенных стрептококков – самых распространенных бактериальных возбудителей заболеваний человека, экономический ущерб от которых уступает лишь потерям от гриппозной инфекции. Входными воротами стрептококковой инфекции являются слизистые оболочки респираторного и мочеполового тракта.

Парентеральный способ введения вакцин не всегда позволяет добиваться одинаково эффективной стимуляции местного иммунитета на слизистых оболочках, а вакцины, вводимые через слизистые оболочки, способны эффективно стимулировать иммунную защиту в области введения, а также обеспечить развитие системного иммунного ответа.

Введение через слизистые оболочки вакцинных препаратов белковой природы требует использования специальных эффективных и безопасных адьювантов, поскольку рекомбинантные белки обычно проявляют недостаточную иммуногенность при таком способе введения. В работе в качестве вакцинных адьювантов при мукозальной иммунизации лабораторных животных пневмококковыми химерными рекомбинантными белками PSPF и PSP были апробированы два штамма пробиотиков – *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 и L32. Рекомбинантные химерные белки PSPF и PSP несут в своей структуре несколько иммуногенных эпитопов PspA, Spr1875, PsaA и предназначены для вакцинации против инфекции *Streptococcus pneumoniae*. Белки, отличие которых связано с присутствием в структуре PSPF участка молекулы флагеллина – FliC, по-разному стимулировали иммунный ответ при совместном введении с двумя штаммами пробиотиков. Установлено, что оба исследованных штамма *L. rhamnosus* были способны оказывать адьювантный эффект при интраназальном введении вакцинных белков, проявлявшийся в усилении секреторного и гуморального иммунного ответа на совместно введенный рекомбинантный химерный белок PSPF. Выраженной стимуляции продукции специфических IgA носовых смывов и IgG сыворотки крови на PSP под влиянием *L. rhamnosus* L32 не происходило. Адьювантный эффект от вводимых лактобациллярных препаратов существенно снижался после температурной инактивации бактерий, однако препарат клеточных стенок *L. rhamnosus* CRL1505 проявлял выраженную активность. Стимуляция иммунного ответа адьювантами приводила к усилению протективного эффекта вакцины в экспериментах на лабораторных животных, инфицированных *S. pneumoniae*.

Адрес для переписки:

Леонтьева Галина Федоровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-74.
E-mail: galeonte@yandex.ru

Address for correspondence:

Leontieva Galina F.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str, 12.
Phone: 7 (812) 234-68-74.
E-mail: galeonte@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.Ф. Леонтьева, Т.А. Крамская, К.Б. Грабовская,
В.Ю. Филимонова, Д. Лайно, Д. Виллена, С. Альварес,
В.Н. Даниленко, А.Н. Суворов «Использование лактобацилл
в качестве адьювантов при интраназальной иммунизации
химерной пневмококковой вакциной» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 545-554.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-545-554

For citation:

G.F. Leontieva, T.A. Kramskaya, K.B. Grabovskaya,
V.Yu. Filimonova, J. Laiño, J. Villena, S. Alvares, V.N. Danilenko,
A.N. Suvorov “Evaluation of *Lactobacillus* probiotics as adjuvants
for nasal immunization with chimeric pneumococcal vaccine”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 6, pp. 545-554.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-545-554

Установлено, что некоторые штаммы лактобацилл, в частности *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 и L32, могут быть использованы в качестве адъювантов в составе мукозальных вакцин, однако эта способность зависит от свойств вакцинного препарата и формы введения пробиотиков.

Ключевые слова: лактобациллы, пробиотики, рекомбинантные белки, мукозальные вакцины, адъюванты, пневмококковая инфекция

EVALUATION OF PROBIOTIC *LACTOBACILLUS* AS ADJUVANTS FOR NASAL IMMUNIZATION WITH CHIMERIC PNEUMOCOCCAL VACCINE

Leontieva G.F.^a, Kramskaya T.A.^a, Grabovskaya K.B.^a, Filimonova V.Yu.^a, Laiño J.^b, Villena J.^b, Alvarez S.^b, Danilenko V.N.^c, Suvorov A.N.^{a,d}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), Tucuman, Argentina

^c Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Vaccine protection against photogenic gram-positive bacteria including different species of streptococci is an important problem of contemporary molecular biology. Streptococcal infections are most common bacterial infections surpassing by the economic losses all the infections excluding influenza. The gates of streptococcal infection, oral cavity or vagina, are covered with immune and non-immune mucosal cells that are the first line of defenses. Subcutaneous immunization not always stimulate the local immunity on mucosal surfaces. On the other hand, mucosal vaccination can provide an appropriate local immune response together with systemic protection. However, mucosal immunization often requires usage of special and effective adjuvants especially in case of vaccines based on recombinant proteins.

For protection against *Streptococcus pneumoniae* infection, two chimeric recombinant proteins (PSPF and PSP) have been tested as vaccines. Recombinant proteins PSPF and PSP carry immunogenic epitopes from the respiratory pathogen including PspA, Spr1875 and PsaA. PSPF structure also carries a fraction of flagellin-FliC molecule in comparison with PSP, which does not have this fragment. This portion of PSPF was included as internal adjuvant intended for the stimulation of Toll-like receptor 5.

In this work, the adjuvant capacity of two probiotic strains, *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and *L. rhamnosus* L32 was evaluated. It was demonstrated that both lactic acid bacteria strains were able to provide adjuvant effects by enhancing the mucosal and systemic immune responses after their co-administration with the recombinant chimeric protein PSPF. The adjuvant effect of both *Lactobacillus* strains was significantly decreased after their thermal inactivation. However, the cell walls of bacteria showed a marked adjuvant activity. An improved protection against several *S. pneumoniae* serotypes after mucosal immunization of infant mice with PSPF vaccine with probiotic strains or their cell walls was also demonstrated here.

The recombinant chimeric protein PSPF administered with immunomodulatory probiotic strains or their bacterial components would be a promising vaccine for immunization of humans against *S. pneumoniae*, particularly in children.

Keywords: *Lactobacillus*, probiotics, recombinant proteins, mucosal vaccines, adjuvants, pneumococcal infection

Исследование выполнялось на средства субсидии из федерального бюджета в рамках соглашения № 14.613.21.0023.

Введение

Вакцинация с момента своего введения в медицинскую практику и по настоящее время является действенным средством снижения заболеваемости и смертности от инфекций. Прогресс в развитии современной биологии и медицины, связанный с появлением современных молекулярно-генетических технологий, способствует

разработке новых типов вакцин, эффективных в отношении широко распространенных опасных инфекционных заболеваний. В настоящее время создаются новые формы вакцинных препаратов, апробируются разнообразные адъюванты и пути введения препарата, способные обеспечить оптимальный иммунный ответ и высокую протективную эффективность вакцинации.

Одной из наиболее актуальных задач медико-биологической науки является создание вакцинных препаратов против патогенных стрептококков – самых распространенных бактериальных

возбудителей заболеваний человека, экономический ущерб от которых уступает лишь потерям от гриппозной инфекции. Входными воротами стрептококковой инфекции являются слизистые оболочки респираторного и мочеполового тракта. Очевидно, что одновременная индукция местного и системного иммунного ответа способствует повышению эффективности процесса вакцинации. Парентеральный способ введения вакцин не всегда позволяет добиваться одинаково эффективной стимуляции местного иммунитета на слизистых оболочках различных анатомических зон [8]. Вакцины, вводимые через слизистые оболочки, способны эффективно стимулировать иммунную защиту в области введения, а также обеспечить развитие системного иммунного ответа [17].

Введение через слизистые оболочки вакцинных препаратов белковой природы требует использования специальных эффективных и безопасных адъювантов, поскольку рекомбинантные белки обычно проявляют недостаточную иммуногенность при таком способе введения [6].

В последние годы выявлена способность различных пробиотических штаммов лактобацилл стимулировать реакции врожденного иммунитета [12] и оказывать влияние на формирование адаптивного иммунного ответа.

В настоящей работе исследована возможность применения пробиотических штаммов *Lactobacillus rhamnosus* в качестве адъювантов в составе рекомбинантных химерных вакцин против *Streptococcus pneumoniae*.

Материалы и методы

Микроорганизмы

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* L32 получен из коллекции отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ», штамм CRL1505 предоставлен CERELA culture collection (Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán, Argentina). Бактерии культивировали в среде MRS в течение 24 часов при 37 °С (суточная культура) в анаэробных условиях, отмывали трехкратно центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут и концентрировали в 10 раз.

Термоинактивацию бактерий проводили при 80 °С в течение 30 минут.

Для дезинтеграции и получения компонентов клеточной стенки бактерии разрушали с помощью ультразвука (четырёхкратное озвучивание, время озвучивания – 5 мин, время паузы между импульсами – 60 с, амплитуда – 9 мкм). После разрушения лизат осветляли центрифугированием в течение 20 минут при 3000 об/мин на холо-

де, компоненты бактериальных клеток осаждали центрифугированием при 20000 g в течение 1 часа при охлаждении. Осадок промывали в том же режиме и ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе.

Об эффективности термоинактивации и дезинтеграции судили по результатам высева материала на плотную ростовую среду MRS агара (HIMEDIA, Индия). Отсутствие роста подтверждало полноту разрушения бактериальных клеток.

Подготовку всех вариантов адъюванта проводили из одной и той же суспензии бактерий. Одна доза живых бактерий составила 10⁸ КОЕ/мышь. Одна доза термоинактивированного варианта пробиотика содержала равное количество бактерий. Компоненты стенок бактериальных клеток, полученные из общей бактериальной взвеси, ресуспендировали в физиологическом растворе до исходного объема и далее в соответствии с конечным разведением живой культуры пробиотика.

Штаммы *Streptococcus pneumoniae* 3, 6B, 14, 19F серотипов получали из коллекции Института детских инфекций, Санкт-Петербург. Бактерии культивировали в среде ТХБ (HIMEDIA, Индия) с 20% сыворотки лошади (Биолот, Россия) в течение 24 часов при +37 °С в анаэробных условиях, отмывали PBS трехкратным центрифугированием при 3500 об/мин в течение 20 минут.

Животные

Исследования проводили на беспородных мышах (самки, возраст 10 недель), полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово». Мыши albano Swiss (самки, возраст 3 недели) предоставлены Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), Tucuman, Argentina.

Вакцинные препараты

В работе использованы два белковых химерных рекомбинантных вакцинных препарата – PSPF и PSP-гибридные молекулы, составленные из линейно соединенных иммунодоминантных фрагментов нескольких поверхностных белков патогенных пневмококков. Молекулы первоначально моделировали сначала *in silico*, на компьютере, а затем в лаборатории с применением технологии, включающей химический синтез полноразмерной ДНК молекулы, ее клонирование в экспрессионных векторах с последующей экспрессией белков в эффективных продуцентах [21].

Компьютерное моделирование было осуществлено с помощью пакетов компьютерных программ BLAST (NCBI) ExPASy и алгоритма I-Tasser CASPs (Critical Assessment of protein Structure Prediction) с целью создания реалисти-

ческих моделей белков. Для объединения доменов был осуществлен докинг эпитопных детерминант. Все рекомбинантные белки выделяли и очищали методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-сефарозой (GE Healthcare, Швеция) согласно процедуре, рекомендованной производителем.

Чистоту и количественное содержание белка контролировали с помощью электрофореза в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) в вертикальном пластинчатом аппарате Mini-PROTEAN II (BioRad, США) и методом Лоури соответственно. Уровень содержания ЛПС определяли с помощью ЛАЛ-теста.

Аранжировка эксперимента

В экспериментах по оценке адьювантного эффекта *Lactobacillus rhamnosus* L32 живые, термоинактивированные и дезинтегрированные бактерии вводили четыре раза. В первый день животные получали только пробиотические адьюванты или физиологический раствор. Во второй день проводили иммунизацию смесью адьюванта и химерных белков в дозе 20 мкг/мышь. Через 21 день после первого введения процедуру повторяли в той же последовательности. Исследуемые препараты вводили интраназально под легким эфирным наркозом, объем материала был равен 0,05 мл. Последовательность манипуляций схематически представлена на рисунке 1А.

В экспериментах по оценке адьювантного эффекта *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 термоинактивированную форму бактерий и их клеточные стенки вводили интраназально в смеси с по-

липептидом PSPF в дозе 20 мкг/мышь трижды с интервалом в две недели. Последовательность манипуляций схематически представлена на рисунке 1Б.

Забор крови

Образцы крови от каждого животного собирали в указанные выше сроки из подчелюстной вены. Образцы сыворотки замораживали и хранили при -80 °С.

Получение смывов

Для определения специфических секреторных IgА мышам внутрибрюшинно вводили 0,1 мл 0,5% раствора пилокарпина и через 1-2 минуты собирали 50 мкл секретов непосредственно сразу после начала повышенного слюноотделения. В пробы вносили ингибитор протеаз PMSF до конечной концентрации 1 mM.

Исследуемые специфические антитела и средства их оценки

Содержание специфических IgM, IgG, IgA определяли в ИФА с использованием конъюгатов соответствующих козьих антимышиных антител (Sigma, США).

Статистический анализ

Эксперименты были выполнены в трех повторях. Результаты представлены в виде средних значений и соответствующих им стандартных отклонений. Данные обрабатывали с использованием пакета программ анализа данных в Excel (однофакторный дисперсионный анализ, описательная статистика). Отличия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

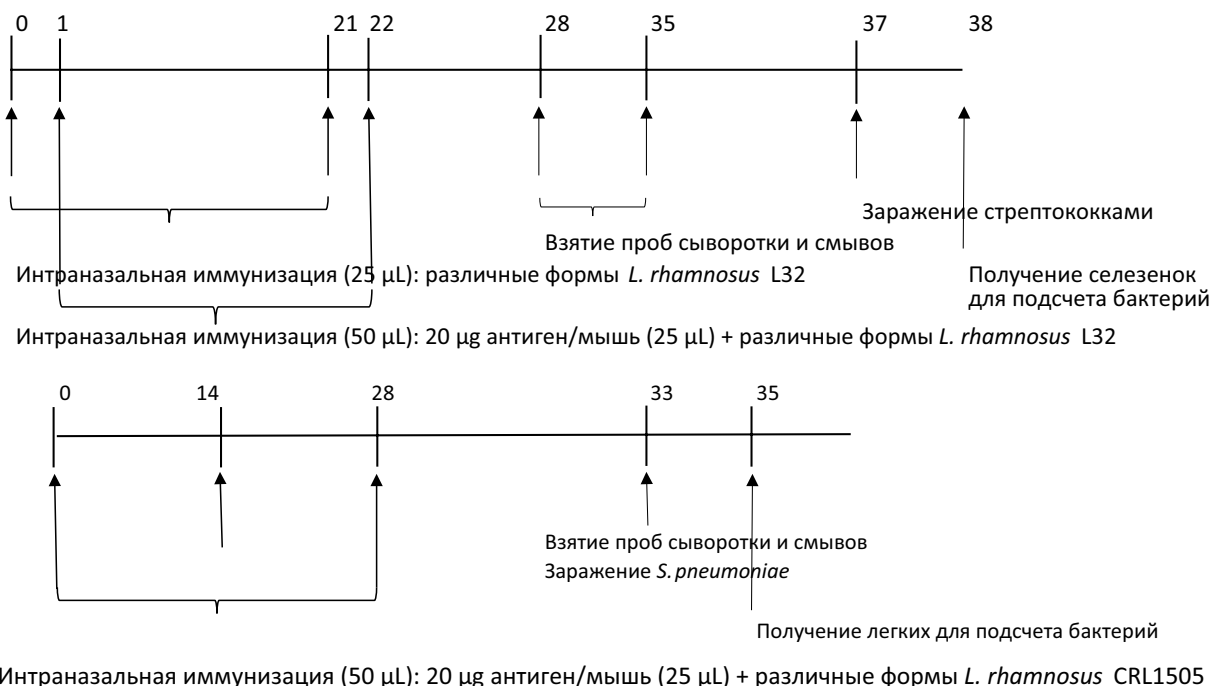


Рисунок 1. Схема постановки эксперимента

Результаты

Изучение адъювантных свойств *L. rhamnosus* CRL1505

Адъювантный потенциал пробиотического штамма CRL1505 изучали в отношении химерного белка PSPF. Мыши линии Swiss в возрасте 3 недель были трехкратно иммунизированы интраназально свободным полипептидом, а также его смесью с термоинактивированным пробиотиком или клеточными стенками бактерий в соответствии со схемой эксперимента (рис. 1А). Установлено, что клеточные стенки пробиотического штамма *L. rhamnosus* CRL1505 проявляли выраженный адъювантный эффект и достоверно стимулировали продукцию специфических сывороточных IgM и IgG, а также IgA и IgG бронхоальвеолярных смывов в отличие от термоинактивированной формы лактобацилл, которая достоверно повышала только концентрацию PSPF-специфических IgM (рис. 2).

Протективный потенциал иммунного ответа соответствовал уровню иммунной реакции на специфический антиген. Процесс выведения из легких *S. pneumoniae* всех четырех исследованных серотипов был более интенсивным в группе, иммунизированной белком PSPF совместно с клеточными стенками пробиотика. На момент контроля протективности количество пневмококка в легких животных из этой группы было самым низким, а отличия от других групп достоверны (рис. 3).

Изучение адъювантных свойств *L. rhamnosus* L32

Иммуномодулирующие свойства пробиотического штамма *L. rhamnosus* L32 в отношении белков PSPF и PSP исследовали на модели беспородных мышей по схеме, указанной на рисунке 1Б. В процессе развития иммунного ответа на двукратную интраназальную вакцинацию проводили сравнительный анализ содержания антигенспецифических антител классов А и G в носовых смывах и сыворотках животных. Рекомбинантные химерные вакцинные препараты PSPF, PSP вводили индивидуально или совместно с различными формами пробиотика.

Установлено, что совместное использование живой культуры *L. rhamnosus* L32 и белка PSPF приводило к стимуляции уровня специфических IgA и IgG антител. После повторной вакцинации средние показатели концентрации сывороточных IgG в группе животных, получавших пробиотик, достоверно превышали показатели в контрольной группе без пробиотика. Под влиянием живого пробиотического штамма происходило ускоренное накопление секреторных антител

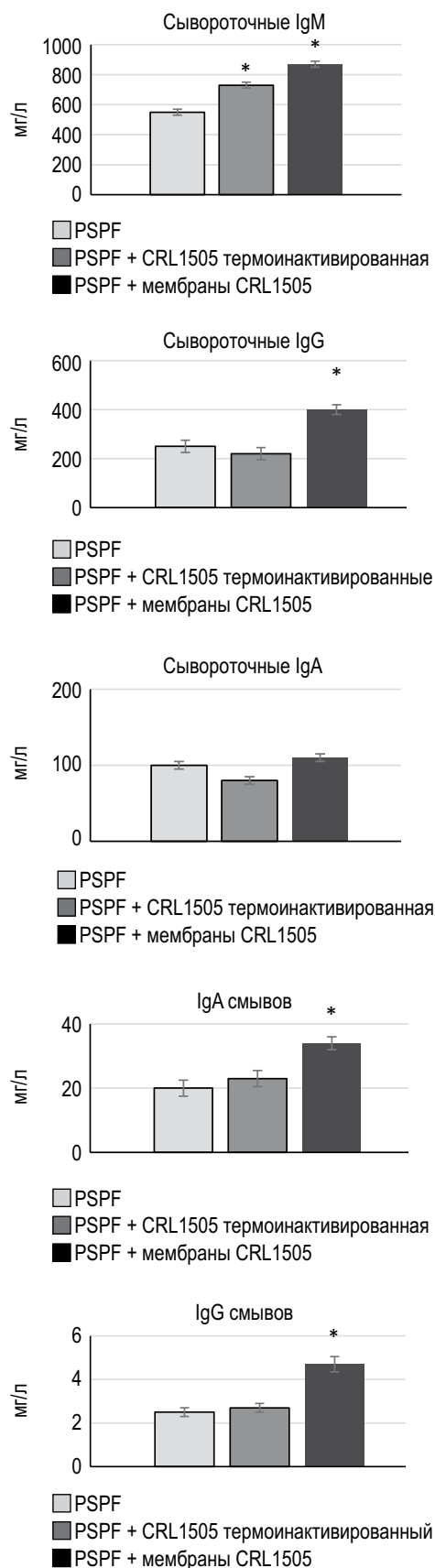


Рисунок 2. Иммунный ответ на вакцинацию белком PSPF совместно с *L. rhamnosus* CRL1505

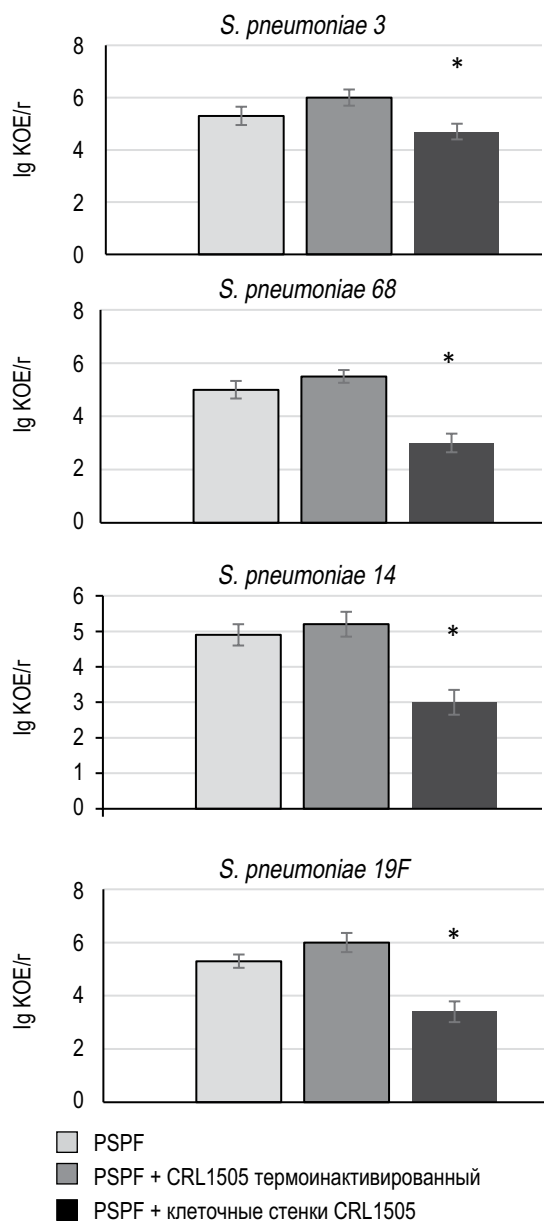


Рисунок 3. Содержание *S. pneumoniae* в легких мышей, иммунизированных белком PSPF совместно с *L. rhamnosus* CRL1505, через 48 часов после инфекции

Примечание. * – отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$.

в носовых смывах, что было зарегистрировано на 28 и 35 день от начала эксперимента (рис. 4А).

Термоинактивация *L. rhamnosus* L32 полностью устраняла адъювантный эффект в отношении IgG антител. В группе животных, вакцинированных пробиотиком после его дезинтеграции ультразвуком, отмечена тенденция к повышению средних показателей концентрации специфических IgG. В отношении секреторного иммунного ответа как термоинактивированная, так и дезинтегрированная форма *L. rhamnosus* L32 обеспечи-

вали превышение средних показателей на протяжении всего срока наблюдения.

В отношении белка PSP адъювантный эффект живой культуры *L. rhamnosus* L32 не проявился, средние показатели секреторного и гуморального иммунного ответа в контрольной и опытной группе практически не отличались (рис. 4Б).

Сравнение уровня протективной эффективности иммунитета, стимулированного вакцинацией мышей белками PSPF и PSP в свободной форме и в присутствии пробиотического адъюванта, проводили на модели пневмококковой инфекции у мышей после внутрибрюшинного заражения штаммом 73 *S. pneumoniae* (рис. 5А).

Через 24 часа после заражения оценивали содержание бактерий в селезенках инфицированных животных. Установлено, что в группе мышей, вакцинированных PSPF в присутствии живой и дезинтегрированной пробиотической культуры, наблюдалось ускоренное выведение бактерий из организма по сравнению с контрольными мышами, вакцинированными в отсутствие адъюванта. Термоинактивированный вариант пробиотического штамма не способствовал повышению устойчивости к инфекции.

Пневмококковая инфекция у мышей, иммунизированных PSP в свободной форме и в сочетании с живым пробиотическим штаммом L32, протекала одинаково. Количество бактерий в селезенке через 24 часа от начала инфекции практически не отличалось (рис. 5Б).

Обсуждение

Пневмококковая инфекция, приводящая к развитию большинства бактериальных пневмоний и острых отитов у детей, входит в число наиболее острых проблем здравоохранения во всех странах мира. Несмотря на успехи антибиотикотерапии, средств диагностики и профилактики заболеваний, показатели смертности от пневмококковых заболеваний остаются высокими.

Полисахаридные и конъюгированные пневмококковые вакцины, имеющиеся на рынке вакцинных препаратов, не могут обеспечить необходимой эффективности профилактических мероприятий из-за присущих им недостатков, связанных со спецификой иммунного ответа к полисахаридным антигенам и ограниченностью антигенного состава существующих вариантов. В настоящее время выявлено около 100 различных серотипов пневмококков, причем их распределение в разных странах варьирует в зависимости от антигенного состава наиболее широко используемой вакцины. На мировом рынке

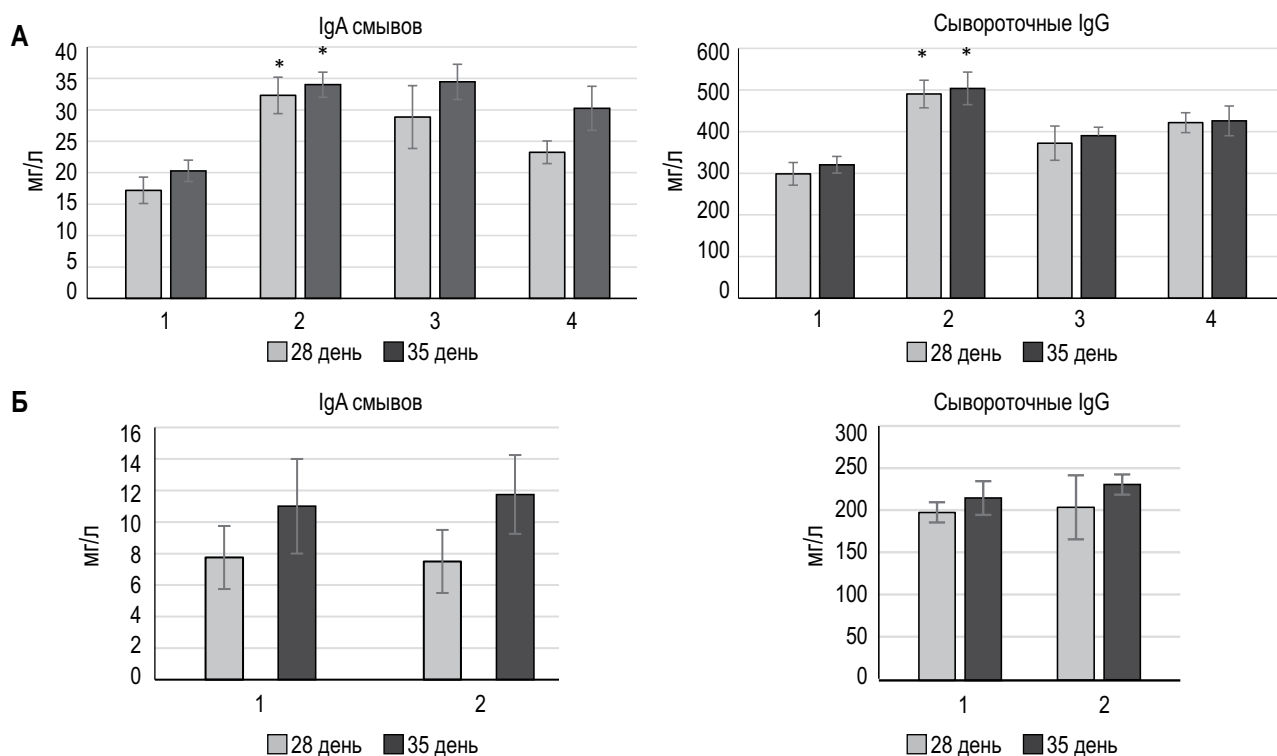


Рисунок 4. Иммунный ответ на вакцинацию белками PSPF (А) и PSP (Б) совместно с *L. rhamnosus* L32.

Примечание. Вакцинный препарат содержал: 1 – белок без адъюванта; 2 – белок и живую форму L32; 3 – белок и термоинактивированный L32; 4 – белок и клеточные стенки L32; * – отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$.

выпускаются четыре пневмококковые вакцины: 23-валентная полисахаридная, доступная с 1980 года и конъюгированные 7, 10 и 13-валентные, которые присутствуют на рынке с 2009 года, причем первая из них постепенно теряет популярность в силу нестойкости иммунитета [2]. В связи с необходимостью качественного усовершенствования вакцин и расширения их количества в 2001 году в рамках инициативы ВОЗ (IVR) были приняты специальные программы содействия различным проектам в области исследований и разработки вакцин против инфекционных болезней, имеющих наибольшую значимость для общественного здравоохранения [25]. С развитием молекулярных технологий в последнее время появилась возможность конструирования рекомбинантных вакцин на основе поверхностных бактериальных белков. Преимуществом такого рода вакцин является существенно более длительный иммунитет и консерватизм поверхностных белковых антигенов.

Исследованные в работе вакцинные препараты – белки PSPF и PSP – представляют собой рекомбинантные химерные молекулы, которые составлены из последовательно соединенных фрагментов нескольких поверхностных белков *S. pneumoniae*. Молекулы рекомбинантных бел-

ков первоначально моделировали *in silico*, а затем получали экспериментально с применением технологии, включающей химический синтез полноразмерной ДНК-молекулы, ее клонирование в экспрессионных векторах с последующей экспрессией белков в эффективных продуцентах [21].

Проектирование химерных конструкций проводилось на основе результатов собственных экспериментальных исследований рекомбинантных аналогов ряда поверхностных белков патогенных стрептококков [3, 20, 24].

Аминокислотную последовательность белков PSPF и PSP составляют иммунодоминантные фрагменты поверхностных белков *S. pneumoniae* – PsaA, PspA and Spr1875, а в состав PSPF входят С- и N-концевые фрагменты флагеллина. Ранее было показано, что химерные белки иммуногенны, а специфический иммунный ответ обеспечивает защиту от пневмококковой инфекции [21].

Входными воротами инфекций, вызываемых многими патогенными бактериями, является слизистая оболочка респираторного тракта. Эффективность вакцинации определяется свойствами вакцинного препарата, способом их введения и природой использованных адъювантов [11, 18, 22]. Подобно тому как респираторные инфекции

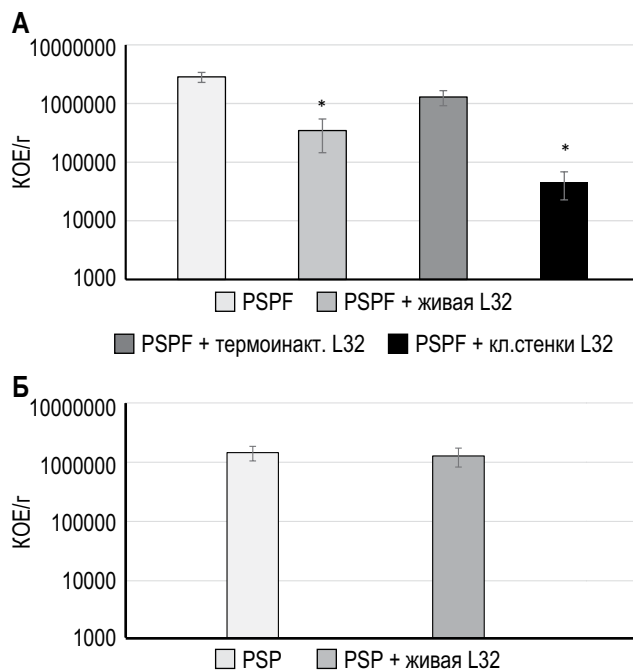


Рисунок 5. Содержание *S. pneumoniae* в селезенках мышей, иммунизированных белками PSPF (А) и PSP (Б) совместно с *L. rhamnosus* L32, через 24 часа после инфекции

Примечание. * – отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$.

стимулируют развитие местного и системного иммунного ответа, введение вакцин непосредственно через слизистые оболочки также приводит к развитию иммунных реакций на слизистых и в крови [4, 13, 14, 16]. Парентеральный путь иммунизации обеспечивает формирование системного иммунитета, но не всегда способствует индукции достаточной иммунной реакции на слизистых оболочках [5, 7, 14].

Исследование адъювантных свойств пробиотиков проводили в динамике развития иммунного ответа на вакцинные препараты, введенные интраназально. Известно, что вакцинные препараты, введенные интраназально, обычно требуют использования безопасного и эффективного адъюванта для повышения иммуногенности. В разрешенных к применению бактериальных вакцинах «Dukoral» и «Vivotif» адъювантами являются сами инактивированные или аттенуированные бактерии *Vibrio Cholerae* и *Salminella Thyphi* [17], в некоторых вакцинах, находящихся на стадии клинических исследований в качестве адъювантов используются искусственно ослабленные бактериальные токсины [9]. Некоторые полезные для человека пробиотические лактобациллы также способны повышать устойчивость организма к инфекции, оказывая влияние на механизмы врожденного иммунитета [3, 5].

В настоящем исследовании в качестве вакцинных адъювантов были апробированы пробиотические штаммы *L. rhamnosus* CRL 1505 и L32. Их адъювантные свойства были сопоставлены при мукозальной вакцинации лабораторных животных рекомбинантными химерными белками PSPF и PSP.

Штамм *L. rhamnosus* CRL1505, выделенный в Аргентине, был ранее всесторонне исследован, доказаны его иммуномодулирующие свойства как в качестве препарата живых бактерий, так и в случае его термоинактивации [23]. Отечественный штамм *L. rhamnosus* L32 был выделен из микробиоты человека, полностью генетически охарактеризован, его иммуномодулирующие свойства исследованы на культуре ткани и в организме лабораторных животных [1].

Клеточные стенки *L. rhamnosus* CRL1505 достоверно повышали концентрацию IgA, IgM и IgG в сыворотке крови и в бронхоальвеолярных смывах мышей. После предварительной инактивации прогреванием данный пробиотический штамм не оказывал влияния на уровень иммунного ответа на белок PSPF. В то же время клеточные стенки, выделенные после ультразвуковой дезинтеграции бактерий, стимулировали продукцию специфических антител.

Протективная эффективность иммунного ответа в условиях интраназальной пневмококковой инфекции у иммунных мышей коррелировала с данными иммунологического анализа. Уровень защиты был выше в группе, получавшей вакцину с препаратом клеточных стенок пробиотика. Существенно, что адъювантный эффект препарата проявлялся по отношению к штаммам пневмококков четырех различных серотипов, что подтверждает универсальный характер вакцины по отношению к пневмококкам с различными полисахаридными антигенами. Последнее связано с широкой специфичностью химерного рекомбинантного белка PSPF благодаря включению в его состав фрагментов поверхностных бактериальных белков с консервативной структурой, общей для большинства серотипов *S. pneumoniae* [21].

Иммуномодулирующее влияние *L. rhamnosus* L32 зависело от формы введения пробиотического штамма. Наибольшей иммуностимулирующей активностью обладали живые бактерии.

Интактная форма лактобацилл усиливала секреторный ответ на PSPF. В носовых секретах после второй вакцинации происходило ускоренное накопление IgA антител. Пробиотик также

повышал уровень специфических IgG в сыворотках крови мышей.

Клеточные стенки бактерий стимулировали специфический иммунный ответ в меньшей степени по сравнению с живой культурой. Термоинактивация полностью устраняла стимулирующий эффект аналогично *L. rhamnosus* CRL1505.

В отличие от PSPF иммунный ответ на рекомбинантный белок PSP практически не изменялся под влиянием совместно введенного *L. rhamnosus* L32, независимо от его формы. Обнаруженный феномен, возможно, объясняется тем, что в структуру PSPF входит С- и N-концевые фрагменты флагеллина, а белок PSP их не содержит. Флагеллин, структурный компонент грамотрицательных бактерий, обладает иммуностимулирующим эффектом благодаря высокому сродству к Toll-like рецепторам 5 типа, активирующим механизмы врожденной защиты. Связываясь с TLR5 на поверхности CD11c⁺ антигенпредставляющих клеток, флагеллиновый фрагмент химерного рекомбинантного белка способен обеспечить преимущество такой молекулы в стимуляции CD4⁺T-зависимого гуморального иммунного ответа [15].

Ранее нами было показано, что в одинаковых условиях иммунизации рекомбинантный белок PSPF обеспечивал более высокий уровень выработки специфических IgG, чем PSP [21]. Таким образом, адъювантный эффект лактобацилл проявлялся только в отношении белка PSPF, обладавшего собственным внутренним адъювантом.

Контроль за инфекцией у мышей, иммунизированных различными вариантами вакцин, позволяет заключить, что ускорение процесса очищения тканей инфицированных животных отмечено там, где наблюдается повышенный уровень иммунного ответа. Таким образом, адъ-

ювантный эффект пробиотических штаммов, вводимых одновременно с рекомбинантными химерными белками, повышает иммуногенность вакцины и способствует усилению устойчивости экспериментальных животных к пневмококковой инфекции.

Проведенные исследования показали, что два различных штамма *L. rhamnosus* были способны оказывать адъювантный эффект, проявлявшийся в усилении иммунного ответа на совместно введенный рекомбинантный химерный белок PSPF. Оба исследованных штамма теряли данное свойство после термоинактивации. Штамм *L. rhamnosus* L 32 был активен в интактном состоянии, клеточные стенки пробиотика также обеспечивали умеренный адъювантный эффект. Штамм *L. rhamnosus* CRL1505 в данной работе в форме живых бактерий не был исследован, однако его клеточные стенки обладали выраженным адъювантным эффектом. Все вышесказанное свидетельствует о том, что пробиотические лактобациллы могут быть использованы в составе мукозальных вакцин в качестве адъювантов, однако эта способность зависит от свойств вакцинного препарата и формы введения пробиотика.

С одной стороны, возможность избежать использования живых бактериальных культур повышает безопасность и стабильность адъюванта. С другой стороны, исключая использование живых бактерий при иммунизации, можно потерять собственно пробиотический эффект живых культур, а именно повышение общей устойчивости организма [12]. Последнее в сочетании с усилением адаптивного иммунитета способно обеспечить усиленную защиту на пути развития пневмококковых инфекций.

Список литературы / References

1. Аверина О.В., Ермоленко Е.И., Ратушный А.Ю., Тарасова Е.А., Борщев Ю.Ю., Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Котылева М.П., Даниленко В.Н., Суворов А.Н. Влияние пробиотиков на продукцию цитокинов в системах *in vitro* и *in vivo* // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 443-454. [Averina O.V., Ermolenko E.I., Ratushnyi A.Yu., Tarasova E.A., Borshev Yu.Yu., Leontieva G.F., Kramskaya T.A., Kotyleva M.P., Danilenko V.N., Suvorov A.N. Influence of probiotics on cytokine production in the *in vitro* and *in vivo* systems. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 443-454. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-443-454>
2. Европейское региональное бюро ВОЗ // Еженедельный эпидемиологический бюллетень, 87-й год. № 14, 2012. Т. 87. С.129-144. [European Region WHO Bureau. *Ezhenedel'nyy epidemiologicheskyy byulleten' = Weekly Epidemiological Record (WER)*, 87 year, 2012, Vol. 87, no. 14, pp. 129-144. (In Russ.)]
3. Крамская Т.А., Леонтьева Г.Ф., Грабовская К.Б., Королева И.В., Гупалова Т.В., Кулешевич Е.В., Суворов А.Н. Исследование защитных механизмов действия препарата поливалентной рекомбинантной вакцины на основе консервативных белков для профилактики инфекций, вызываемых стрептококками группы В // Медицинский алфавит, 2014. № 3. С. 95-98 (Больница). [Kramskaya T.A., Leontieva G.F., Grabovskaya K.B., Koroleva I.V., Gupalova T.V., Kuleshevitch E.V., Suvorov A.N. Evaluation of defense mechanisms of polyvalent recombinant vaccine based on conservative proteins for Streptococcus Group B diseases protection. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alfabeth*, 2014, no. 3, pp. 95-98 (Hospital). (In Russ.)]
4. Baron S.D., Singh R., Metzger D.W. Inactivated Francisella tularensis live vaccine strain protects against respiratory tularemia by intranasal vaccination in an immunoglobulin A-dependent fashion. *Infect. Immun.*, 2007, Vol. 75, pp. 2152-2162.
5. Belyakov I.M., Derby M.A., Ahlers J.D., Kelsall B.L., Earl P., Moss B., Strober W., Berzofsky J.A. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-1 vaccine challenge *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, Vol. 95, pp. 1709-1714.

6. Bergmann-Leitner E.S., Leitner W.W. Adjuvants in the driver's seat: How magnitude, type, fine specificity and longevity of immune responses are driven by distinct classes of immune potentiators. *Vaccines (Basel)*, 2014, no. 2, pp. 252-296.
7. Gallichan W.S., Rosenthal K.L. Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. *J. Exp. Med.*, 1996, Vol. 184, pp. 1879-1890.
8. Holmgren J., Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.*, 2005, no. 4, pp. 45-53.
9. Savelkoul H.F., Ferro V.A., Strioga M.M., Schijns V.E. Choice and design of adjuvants for parenteral and mucosal vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2015, Vol. 3, no. 1, pp. 148-171.
10. Jain, S., Yadav, H., Sinhá, P.R. Stimulation of innate immunity by oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus casei* in mice. *J. Méd. Food*, 2008, Vol. 11, pp. 652-656.
11. Kinnear C.L., Strugnell R.A. Vaccination method affects immune response and bacterial growth but not protection in the *Salmonella* Typhimurium animal model of typhoid. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 10, p. e0141356.
12. Kitazawa H., Alvarez S., Suvorov A., Melnikov V., Villena J., Sánchez B. Recent advances and future perspective in microbiota and probiotics. *Biomed. Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, Art. 275631.
13. Li F.V., Moon J.J., Abraham W., Suh H., Elkhader J., Seidman M.A., Yen M., Im E.-J., Foley M.H., Barouch D.H., Irvine D.J. Generation of effector memory T cell-based mucosal and systemic immunity with pulmonary nanoparticle vaccination. *Sci. Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 204.
14. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 592-605.
15. Mizel S.B., Bates J.T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J. Immunol*, 2010, Vol. 185, no. 10, pp. 5677-5682.
16. Mora J.R., Bono M.R., Manjunath N., Weninger W., Cavanagh L.L., Roseblatt M., Von Andrian U.H. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*, 2003, Vol. 424, pp. 88-93.
17. Nizard M., Diniz M.O., Rousse H., Tran T., Ferreira L.C.S., Badoua C., Tartour E. Mucosal vaccines Novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites Mucosal immunity and vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2014, Vol. 10, no. 8, pp. 2175-2187.
18. Peng S., Qiu J., Yang A., Yang B., Jeang J., Wang J.-W., Chang Y.-N., Brayton C., Roden B.S., Hung C., Wu T.-C. Optimization of heterologous DNA-prime, protein boost regimens and site of vaccination to enhance therapeutic immunity against human papilloma virus-associated disease. *Cell Biosci.*, 2016, Vol. 6, p. 16.
19. Salva S., Villena J., Alvarez S. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: impact on intestinal and respiratory infections. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, Vol. 141, pp. 82-89.
20. Suvorov A., Ustinovich I., Meringova L., Grabovskaya K., Leontieva G., Vorobieva E., Totolian A.. Construction of recombinant polypeptides based on beta antigen C (Bac) protein and their usage for protection against group B streptococcal infection. *Indian J. Med. Res.*, 2004, pp. 228-232.
21. Suvorov A., Dukhovlinov I., Leontieva G., Kramskaya T., Koroleva I., Grabovskaya K., Fedorova E., Chernyaeva E., Klimov N., Orlov A., Uversky V. Chimeric protein PSPF, a potential vaccine for prevention *Streptococcus*. *Vaccines and Vaccination*, 2015, Vol. 6, Iss. 6.
22. Trivedi S., Ranasinghe C. The influence of immunization route, tissue microenvironment, and cytokine cell milieu on HIV-specific CD8⁺ T cells measured using fluidigm dynamic arrays. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 5, p. e012648
23. Villena J., Salva S., Núñez M., Corzo J., Tolaba R., Faedda J., Font de Valdez G., Alvarez S. Probiotics for everyone! The novel immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and the beginning of social probiotic programs in Argentina. *IJBWI*, 2012, pp. 189-198.
24. Vorobieva E., Meringova L., Leontieva G., Grabovskaya K., Suvorov A. Analysis of recombinant group B streptococcal protein ScaAB and evaluation of its immunogenicity. *Folia Microbiol.*, 2005, pp. 172-176.
25. WHO initiative for Vaccine Research. <http://www.who.int/immunization/research/en>

Авторы:

Леонтьева Г.Ф. — к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Крамская Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Грабовская К.Б. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Филимонова В.Ю. — научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Лайно Джонатан — научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, Референсный центр по исследованию лактобацилл, Тукуман, Аргентина
Виллена Джулио — профессор, руководитель лаборатории иммунобиотехнологии, Референсный центр по исследованию лактобацилл, Тукуман, Аргентина
Альварес Сусанна — научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, Референсный центр по исследованию лактобацилл, Тукуман, Аргентина
Даниленко В.Н. — д.б.н., профессор, заведующий отделом генетических основ биотехнологии ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, Россия
Суворов А.Н. — д.м.н., профессор, заведующий отделом молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; заведующий кафедрой фундаментальных проблем медицины и медицинской технологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Поступила 27.07.2016

Отправлена на доработку 29.08.2016

Принята к печати 01.09.2016

Authors:

Leontieva G.F., PhD (Biology), Leading Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kramskaya T.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Grabovskaya K.B., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Filimonova V.Yu., Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Jonathan Laino, Postdoctoral Fellow, Laboratory of Immunobiotechnology, Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), Tucuman, Argentina

Julio Villena, Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), Tucuman, Argentina

Susana Alvarez, Professor, Head, Laboratory of Immunobiotechnology, Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), Tucuman, Argentina

Danilenko V.N., PhD, MD (Biology), Head, Division of Fundamental Genetic Studies in Biotechnology, Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Suvorov A.N., PhD, MD (Medicine), Head, Division of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Received 27.07.2016

Revision received 29.08.2016

Accepted 01.09.2016