© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

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

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

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

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

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 10—15

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

E.O.Kalinichenko, S.A.Skhodova, N.K.Akhmatova, N.A.Mikhailova

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

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

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

ral blood. The maximum increase in the number of phagocytized monocytes was observed on the 7th, and granulocytes on the 17th day after the first immunization. Booster immunization did not lead to additional stimulation of phagocytic activity, but the number of phagocytic cells was significantly ($p<0.05$) higher than control (intact mice). *Conclusion*. Candidate vaccine against *P. aeruginosa* based on its recombinant proteins OprF and aTox activates the cellular unit of the immune system with the induction of the activity of professional macrophages.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 10—15

Key words: recombinant proteins OprF and aTox of *Pseudomonas aeruginosa*, phagocytosis, bactericidal activity

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызываемые Pseudomonas aeruginosa, представляют важную проблему медицинской практики. Факторами, определяющими трудности терапии этой патологии, являются значительная резистентность возбудителя к широкому спектру антибиотиков, хронический характер течения болезни, а также развитие ее на фоне снижения эффекторных функций врожденного иммунитета и соответственно резистентности организма к инфекции [9, 10].

Вторичные иммунодефицитные состояния могут приводить к затяжному течению, хронизации воспалительных процессов, частым рецидивам и осложнениям [1]. Этим определяется необходимость комплексной терапии синегнойной инфекции с использованием антибиотиков, ингибирующих развитие микроорганизма, и иммунотропных препаратов, воздействующих на ключевые эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета, активация которых должна способствовать полной элиминации возбудителя.

Исходя из современных представлений [4 — 8, 11, 12] о роли врожденного иммунитета, обеспечивающей не только первую линию защиты с немедленным сдерживанием распространения патогена, но участвующей также в процессинге, презентации антигена Т-лимфоцитам и осуществлении при этом инструктивной функции, определяющей направленность пути развития адаптивного иммунитета, становится необходимым проведение при синегнойной инфекции комплексных мероприятий профилактического характера с использованием препаратов, активирующих систему врожденного иммунитета, а также одновременно индуцирующих эффекторы адаптивного иммунитета к синегнойной палочке. В НИИВС им. И.И.Мечникова ведется разработка кандидатной вакцины против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox (делеционной атоксической формы экзотоксина А), сорбированных на гидроксиде алюминия.

Цель работы — изучить влияние иммунизации вакцинным препаратом против синегнойной палочки на фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов периферической крови у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат: 25 мкг OprF, 50 мкг aTox, сорбированные на 75 мкг гидроксида алюминия (НПО Микроген). Для иммунизации препарат рекомбинантных белков смешивали в равных весовых долях с гелем гидроксида алюминия, разводили в фосфатно-солевом буфере и проводили сорбцию в течение 12 ч при 4°С. Вакцинный препарат вводили мышам-самкам линии BALB/c весом 14 — 16 г внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл.

Фагоцитараную активность определяли по поглотительной способности убитых нагреванием микробных клеток S. aureus нейтрофилами и моноцитами периферической крови иммунизированных мышей (n=10). Убитые нагреванием бактерии окрашивали FITC. К периферической крови мышей прибавляли FITC-меченные бактерии (10^9 микробных клеток/мкл).

Количество нейтрофилов и моноцитов, захвативших FITC-меченные бактерии, определяли с помощью проточной цитометрии (Cytomix FC-500, Beckman Coulter, США с СХР программым обеспечением). Гейт клеточной популяции определяли путем оценки фронтального и бокового светорассеивания и размера клеток; в каждом гейте оценивали 10 000 клеток. Результат представляли как процент нейтрофилов или моноцитов, фагоцитировавших убитые нагреванием FITC-меченные бактериальные клетки S. aureus.

Бактерицидную активность лейкоцитов крови мышей оценивали в отношении живой культуры S. aureus на проточном цитофлюориметре FC-500 (Beckman Coulter, США) в координатах FL1 и FL3. Лейкоцитарную суспензию, полученную на сроки 4 и 24 ч после иммунизации, инкубировали в течение 1 и 3 ч с суспензией живых микробных клеток S. aureus, меченных FITC. Непоглощенные лейкоцитами микробные клетки удаляли центрифугированием. Через 1 и 3 ч инкубации лейкоциты, захватившие живые бактерии, разрушали 10 мМ карбонатно-бикарбонатным буфером, содержащим 0,2% сапонина (Sigma, США). Погибшие внутриклеточно микробные клетки окрашивали йодидом пропидия. Этот флуорохром предназначен для окрашивания убитых микробных клеток. Среди общей популяции клеток S. aureus, окрашенных FITC, определяли процент убитых клеток стафилококка, окрашенных йодидом пропидия, и вычисляли процент убитых микробных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мышей иммунизировали дважды с интервалом в 14 дней. Исследовали фагоцитарную активность моноцитов и гранулоцитов по поглотительной способности S. aureus через 7 и 14 дней после каждой иммунизации (табл.). На 7 сутки после первой иммунизации отмечено повышение уровня фагоцитоза бактериальных клеток моноцитами в 1,82 раза, гранулоцитами в 1,46 раза по сравнению с интактными мышами. Высокий уровень активности фагоцитов сохранялся также на 14 сутки (76,64% моноцитов, повышение в 1,8 раза; 90,64% гранулоцитов, повышение в 1,7 раза по сравнению с контролем).

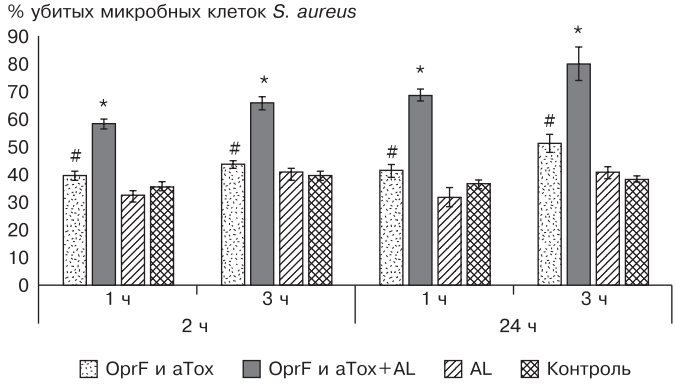
Повторное введение препарата не приводило к дополнительной стимуляции фагоцитов, так как уровень их активности на 7 и 14 сутки значимо снижался по сравнению с первой вакцинацией (с 63,08% до 67,38 — 63,08% — моноциты; с 90,64% до 75,02 — 73,58% — гранулоциты). Но активность профессиональных фагоцитов оставалась достаточно высокой по сравнению с контрольной группой, превышая значения в 1,5 раза (моноциты) и 1,4 раза (гранулоциты).

Оценка бактерицидной активности лейкоцитов под действием антигенных препаратов является одним из показателей активации врожденного иммунитета. Проведено сравнительное изучение бактерицидной активности лейкоцитов периферической крови мышей через 4 и 24 ч после однократной иммунизации рекомбинантными белками P. aeruginosa OprF и aTox, не сорбированными и сорбированными на гидроксиде алюминия, в отношении гетерологичного микроорганизма — убитых микробных клеток S. aureus (рис.).

Влияние иммунизации белками P.aeruginosa OprF и aTox на фагоцитарную активность клеток у мышей

Рек. белки OprF и aTox+AL	Моноциты, %	Достоверность различий между группами	Гранулоциты, %	Достоверность различий между группами
	M±SD Med(25%—75%)		M±SD Med(25%—75%)	
Контроль	42,76±1,33 43(42,5—43)	$P_{1и2}$=0,0121 $P_{1и3}$=0,012 $P_{1и4}$=0,0119 $P_{1и5}$=0,0119	53,22±11,1 51(43—62)	$P_{1и2}$=0,0081 $P_{1и3}$=0,0122 $P_{1и4}$=0,0367 $P_{1и5}$=0,0122
	Первая иммунизация			
7 сут	77,82±5,29 77,59(75,59—82,31)	$P_{2и1}$=0,0121 $P_{2и3}$=0,676 $P_{2и4}$=0,021 $P_{2и5}$=0,012	77,68±4,32 79,9(72,2—80,7)	$P_{2и1}$=0,0081 $P_{2и3}$=0,0122 $P_{2и4}$=0,53 $P_{2и5}$=0,21
14 сут	76,64±2,83 76,8(73,9—78,8)	$P_{3и1}$=0,012 $P_{3и2}$=0,676 $P_{3и4}$=0,0121 $P_{3и5}$=0,0121	90,64±4,14 91,8(88,4—92)	$P_{3и1}$=0,0122 $P_{3и2}$=0,008 $P_{3и4}$=0,037 $P_{3и5}$=0,0122
	Вторая иммунизация			
7 сут	67,38±4,32 68,3(63,7—69)	$P_{4и1}$=0,0119 $P_{4и2}$=0,0215 $P_{4и3}$=0,1218 $P_{4и5}$= 0,144	75,02±13,47 79,3(71,9—79,5)	$P_{4и1}$=0,0367 $P_{4и2}$=0,411 $P_{4и3}$=0,0367 $P_{4и5}$=0,403
14 сут	63,08±2,38 62,8(61,9—64,5)	$P_{5и1}$=0,0119 $P_{5и2}$=0,0122 $P_{5и3}$=0,0121 $P_{5и4}$=0,143	73,58±3,65 73,4(70,2—75,5)	$P_{5и1}$=0,0122 $P_{5и2}$=0,121 $P_{5и3}$=0,012 $P_{5и4}$=0,403

Лейкоциты периферической крови мышей инкубировали с микробными клетками в течение 1 и 3 часов. Установлено, что бактерицидная активность лейкоцитов мышей, иммунизированных сорбированными белками, существенно отличалась от контроля. Усиление бактерицидной активности лейкоцитов происходило уже через 4 часа после введения препарата, что проявлялось в увеличении численности убитых микробных клеток с 57,9 до 65,36% при инкубации в течение 1 и 3 ч соответственно, по сравнению с контролем — 35,2 и 39,12% соответственно. Спустя 24 ч уровень бактерицидной активности лейкоцитов существенно увеличивался и доля убитых микробных клеток составила 68,3 и 79,54% при инкубации 1 и 3 ч соответственно. Несорбированные белки активировали бактерицидную активность позже (через 24 ч) и менее интенсивно, чем сорбированные белки. Гидроксид алюминия в отсутствие белков P. aeruginosa OprF и aTox не активировал бактерицидную активность лейкоцитов крови мышей.



Бактерицидная активность лейкоцитов периферической крови мышей, иммунизированных рекомбинантными белками P.aeruginosa OprF и aTox, в отношении S. aureus.

Достоверность различий между опытом и контролем; * между сорбированными на гидроксиде алюминия и несорбированными белками, p<0,05. Тест Манна-Уитни для независимых выборок.

Таким образом, введение мышам препарата приводило к усилению фагоцитарной и бактерицидной активности S. aureus

лейкоцитами периферической крови на все сроки наблюдения. Максимальное повышение численности фагоцитировавших моноцитов отмечено на 7, а гранулоцитов на 17 сутки после первой иммунизации. Бустерная иммунизация не приводила к дополнительной стимуляции фагоцитарной активности, но численность фагоцитировавших клеток была существенно ($p<0,05$) выше контроля (интактные мыши). Усиление бактерицидной активности лейкоцитов происходило уже через 4 часа после введения белков OprF и aTox, сорбированных на гидроксиде алюминия.

Фагоциты признаются важным компонентом врожденного звена иммунного ответа на патогены. Кроме того, в работах последних лет было показано, что фагоцитоз играет существенную роль в гомеостазе и ремоделировании тканей [2]. Оценка фагоцитарной активности характеризует функциональную активность иммунокомпетентных клеток, а вместе с тем, их способность распознавать и элиминировать из организма все чужеродное: микроорганизмы, а также трансформированные собственные клетки и ткани.

Кроме фагоцитарной функции профессиональные фагоциты играют ключевую роль в индукции адаптивного иммунного ответа, благодаря синтезу провоспалительных цитокинов, привлекающих в очаги инфекции соответствующие лимфоидные клетки, а также обеспечивают процессинг и представление антигена Т-лимфоцитам, определяющих поляризацию иммунного ответа [3].

Иммуносупрессивные состояния у современного человека стали главным вопросом медицины и источником проблем со здоровьем. Важную роль в ослаблении резистентности организма также играет появление новых штаммов, обладающих антибиотикорезистентностью.

Клиническое течение синегнойной инфекции обретает серьезный характер из-за устойчивости возбудителя к широкому спектру антибиотиков, поэтому актуальными становятся профилактика и лечение инфекции как у госпитализированных больных, так и у пациентов с муковисцидозом. Активация клеточного звена иммунной системы под воздействием препаратов на основе антигенов синегнойной палочки имеет важное значение в очищении организма от возбудителя. На основании проведенного фрагмента исследования показано, что рекомбинантные белки P.aeruginosa OprF и aTox, сорбированные на гидроксиде алюминия как при однократной, так и при двукратной иммунизации мышей, оказывали стимулирующее влияние на иммунокомпетентные клетки, которые обладали способностью распознавать бактериальные белки, о чем можно судить по стимуляции фагоцитоза инактивированных бактерий нейтрофилами и моноцитами периферической крови иммунизированных животных. Таким образом, кандидатная вакцина против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox активирует клеточное звено иммунной системы с индукцией активности профессиональных макрофагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова Н.Б, Ефремова В.Н., Курбатова Е., Грубер И.М. Экспериментальная и клинико-иммунологическая оценка бесклеточной стафилококковой вакцины «Стафиловак». Журн. микробиол. 2008, 6:102-108.
2. Лямина С.В., Веденикин Т.Ю., Круглов С.В., Шимшелашвили Ш.Л., Буданова О.П., Малышев И.Ю., Малышев И.Ю. Особенности фагоцитарной и миграционной активности альвеолярных макрофагов М1 и М2 фенотипов. Фундаментальные исследования. 2011, 11 (3): 536-539.
3. Hazlett L.D. Role of innate and adaptive immunity in the pathogenesis of keratitis. Ocul. Immunol. Inflamm. 2005, 13 (2-3): 133-138.

4. Ip W.K.E., Hoshi N., Shouval D.S. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. Science. 2017, 5; 356 (6337): 513-519. doi: 10.1126/science.aal3535.
5. Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nat. Immunol. 2015 Apr; 16 (4): 343-53. doi: 10.1038/ni.3123.
6. Kaufmann S.H.E. Novel vaccination strategieis. Wiley-VCH Verlag GmbH Co KGaA. Weinheim, 2004.
7. Kayama H., Takeda K. Functions of innate immune cells and commensal bacteria in gut homeostasis. J. Biochem. 2016 Feb; 159 (2): 141-9. doi: 10.1093/jb/mvv119.
8. Okabe Y., Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. Nat. Immunol. 2016, 17 (1): 9-17. doi: 10.1038/ni.3320.
9. Rodesney C.A., Roman B., Dhamani N. et al. Mechanosensing of shear by Pseudomonas aeruginosa leads to increased levels of the cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. pii: 201703255. doi: 10.1073/pnas.1703255114.
10. Shteinberg M., Schneer S., Lavon O., Adir Y. Long term treatment with macrolides in chronic lung diseases. Harefuah. 2016, 155 (9): 567-571.
11. Vivier E., Medzhitov R. Editorial overview: Innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 2016;38:v-vii. doi: 10.1016/j.coi.2015.12.005.
12. Wang A., Huen S.C., Luan H.H. et al. Opposing effects of fasting metabolism on tissue tolerance in bacterial and viral inflammation. Cell. 2016, 8; 166 (6): 1512-1525.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.026.

Поступила 31.10.17

Контактная информация: Калиниченко Е.О.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Н.К.Ахматова[1], Е.О.Калиниченко[1], И.Д.Макаренкова[2], Э.А.Ахматова[1], А.И.Тухватулин[3], Д.Ю.Логунов[3], Н.А.Михайлова[1]

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ БЕЛКОВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA OprF И aTox

[1]НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; [2]НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, Владивосток; [3]Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Изучение влияния белков OprF и aTox Pseudomonas aeruginosa на цитокиновый профиль дендритных клеток мышей. *Материалы и методы.* Дендритные клетки (ДК) получали из клеток костного мозга мышей при культивировании с 20 нг/мл рекомбинантных GM-CSF и IL-4 (Biosource, США). В качестве индуктора созревания использовали белки OprF и aTox P. aeruginosa (НИИВС им. И.И.Мечникова). Уровень цитокинов определяли в супернатантах ДК с использованием набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, США). *Результаты.* Оценка профиля и уровня цитокинов, продуцируемых дендритными клетками мышей, демонстрирует высокую активность зрелых ДК. Под воздействием рекомбинантных белков OprF+aTox как несорбированных, так и сорбированных на гидроксиде алюминия, ДК синтезировали большое количество Th-1 цитокинов: IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α, Th-2 цитокинов: IL-4, IL-10, IL-13, регуляторных цитокинов: IL-12, IFN-γ, IL-17A и хемокинов: KC(CXCL1), MIP-1α (CCL3), MIP-1β(CCL4), RANTES (CCL5). В наших исследованиях продемонстрирована возможность получения культуры клеток, состоящей как из зрелых ДК, так и макрофагов из костномозговых предшественников мышей при цитокиновой стимуляции с использованием в качестве индуктора созревания ДК комплекса антигенов P. aeruginosa. *Заключение.* Кандидатная вакцина против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox индуцирует продукцию хемокинов и Th-1, Th-2, Th-17 цитокинов дендритными клетками у мышей.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 15—22