

Использование новых бактериальных адъювантов при вакцинации против гриппа и полиомиелита

С. Л. Рыбалко, М. Л. Христова, А. В. Шапиро, Л. Д. Варбанец¹,
Н. Л. Зубкова, В. И. Задорожная, Н. В. Иванская², И. Б. Сорокулова¹,
Т. Ф. Грицак, Т. М. Фурзикова, И. И. Пинчук¹, Ю. В. Пацковский²,
С. Т. Дядюн, В. В. Смирнов¹, М. А. Урдачи¹

Институт эпидемиологии и инфекционных болезней АМН Украины
Спуск Протасов Яр, 4, Киев, 03038, Украина

¹ Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

² Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*Проведено сравнение активности бактериальных адъювантов — нейрамининов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Bacillus subtilis* 105 по их способности влиять на иммунный ответ при вакцинации вирусами гриппа и полиомиелита. Бактериальные адъюванты стимулируют гуморальный иммунитет, способствуют более раннему появлению (на первой неделе) наряду с IgM и IgG. Авторы предположили, что такая закономерность, по-видимому, связана с пептидной мимикрией нейрамининов и гемагглютининов вирусов гриппа. В эксперименте на животных показано, что нейраминин *S. aureus* стимулирует более продолжительную выработку антител в высоких титрах к полиовирусам типов 1 и 3. Пептидная мимикрия может быть использована для праймирования и увеличения длительности иммунного ответа после бустер-иммунизации. Нейраминины нетоксичны и поэтому перспективны в качестве нового препарата для адъювантной терапии.*

Введение. В последние годы значительно возрос интерес к идее использования адъювантов при вакцинации. Длительное время при вакцинации людей применяли лишь такие адъюванты, как гидроокись и фосфат алюминия [1]. Однако для большинства антигенов эти вещества оказались слабыми иммуностимуляторами. Серьезным недостатком производных алюминия стала их неспособность активировать Т-клетки-хелперы, продуцирующие интерлейкин-2 и γ -интерферон. Многие из нелицензированных адъювантов оказались эффективнее производных алюминия при стимуляции синтеза антител, и клеточно-опосредованного им-

мунного ответа. Наиболее перспективными среди них являются бактериальные адъюванты.

Среди бактериальных адъювантов первое место занимают полный и неполный адъюванты Фрейнда, являющиеся хорошими индукторами клеточного и гуморального иммунитета, однако токсические свойства не дают возможности использовать их в коммерческих вакцинных препаратах [2]. Вариантом адъюванта Фрейнда является адъювант Detox, состоящий из монофосфориллипида А и белков клеточной стенки бактерий. Несмотря на выраженную способность усиливать клеточный и гуморальный иммунный ответ, Detox не рекомендован для вакцинации, поскольку вызывает побочные реакции [3].

В последние годы идентифицированы бактериальные адъюванты — субъединичный холерный токсин В, столбнячный токсин [4, 5], продукты

© С. Л. РЫБАЛКО, М. Л. ХРИСТОВА, А. В. ШАПИРО,
Л. Д. ВАРБАНЕЦ, Н. Л. ЗУБКОВА, В. И. ЗАДОРЖНАЯ,
Н. В. ИВАНСКАЯ, И. Б. СОРОКУЛОВА, Т. Ф. ГРИЦАК,
Т. М. ФУРЗИКОВА, И. И. ПИНЧУК, Ю. В. ПАЦОВСКИЙ,
С. Т. ДЯДЮН, [В. В. СМИРНОВ,] М. А. УРДАЧИ, 2003

жизнедеятельности молочнокислых бактерий [6], рекомбинантный энтеротоксин *Escherichia coli* [7], компоненты стенок бактерий [8], фибронектинсвязывающий белок 1 *Streptococcus pyogenes* [9] и другие адьюванты, способные индуцировать образование антител на поверхности слизистых оболочек, что особенно важно для такой инфекции, как грипп.

Авторами выделены новые бактериальные адьюванты из среды культивирования бактерий, названные нейраминидами (НИ), так как они ингибируют нейраминидазу вируса гриппа [10].

Предположение о том, что бактерии способны синтезировать подобные вещества, высказано в одной из первых работ Лин и соавт. [11], которые показали, что один из штаммов *Streptomyces sp.* выделяет в культуральную среду вещество, ингибирующее нейраминидазную активность вирусов гриппа и парамиксовирусов, и назвали его нейраминином. Первым препаратом, выделенным нами, был НИ *Staphylococcus aureus*.

На этой модели была отработана методика получения препарата, а также изучены его основные биологические свойства, в частности, способность усиливать иммунный ответ, свойственный бактериальным адьювантам.

В работе [12] показано, что полиовирусы типа 1 и 3 при взаимодействии с НИ *S. aureus* приобретают способность более активно репродуцироваться в перевиваемой клеточной культуре НЕР-2, что приводит к повышению их инфекционных титров (соответственно на 2,75 и 1,75 lg ТЦД₅₀/1,0 мл). Для полиовируса типа 2 такой закономерности не выявлено: НИ *S. aureus* не влиял на его инфекционную активность.

Изучена возможность применения НИ *S. aureus* для стимуляции иммунного ответа против полиовирусов типов 1, 2 и 3 после введения оральной полиомиелитной вакцины (ОПВ) в эксперименте на кроликах.

Настоящее исследование посвящено сравнению способности новых бактериальных адьювантов влиять на выработку антител и на иммуногенность гриппозной и полиомиелитной вакцин.

Материалы и методы. Бактериальные культуры. Использованы суточные культуры *S. aureus*, штамм 392, *S. pneumoniae* 1-го типа, *Bacillus subtilis*, штаммы 3 и 105.

Штаммы *S. pneumoniae* культивировали в жидкой питательной среде, содержащей Na₂HPO₄ — 3 г, KCl — 0,6 г, дрожжевой экстракт — 10 г, казеиновая кислота («Difco», США) — 15 г, pH 7,6—7,8. После стерилизации к среде добавляли 10 % лошадиной сыворотки. Суточную культуру пневмо-

кокков на 5 %-м кровяном агаре засеивали в пробирки с жидкой средой в объеме 10 мл. Через 18—20 ч инкубации при температуре 37 °С бульонную культуру пересевали в колбы с этой же средой в объеме 500 мл и выращивали в термостате при 37 °С в течение 1 сут при постоянном встряхивании.

Для выращивания *S. aureus* использовали среду, состоящую из 1 % пептона, 1 % лактозы, 1 % дрожжевого экстракта, 0,33 % MgSO₄ × 7H₂O в фосфатном буфере, pH 7,2. Исходную культуру засеивали в пробирку с 5 мл среды и размножали методом двукратного пересева в 100 мл и затем в 3 л среды. Культивирование осуществляли в течение 24 ч при температуре 37 °С в режиме встряхивания (400 об/мин).

B. subtilis 105 культивировали на среде Гаузе № 2 — бульон Хоттингера (700 мг% NH₂-N-аммонийного азота — 30 мл, пептона — 5 г, NaCl — 5 г, глюкозы — 10 г, дистиллированной воды — до 1 л) в течение 18—20 ч при температуре 37 °С.

Вирус гриппа А/Шандонг/9/93/H₃N₂/ — инфекционный титр аллантоисной культуры вируса составлял 8,0—8,5 lg ЭИД₅₀/0,2 мл, титр гемагглютининов — 256—512 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ) в 0,2 мл;

Вирус гриппа А/Сингапур/6/86/H₁N₁/ — инфекционный титр — 7,5 lg ЭИД₅₀/0,2 мл, титр гемагглютининов — 128—256 ГАЕ/0,2 мл.

Вакцина *Agrippol S1* («Bioscine», Италия) — антигриппозная субъединичная вакцина, в состав которой входят гемагглютинины вирусов А/Шандонг/9/93/H₃N₂/, А/Сингапур/6/86/H₁N₁/ и В/Панама/45/90. В 0,5 мл вакцины содержалось 45 мкг гемагглютинина.

Вакцина против полиомиелита состоит из штаммов Себина типов 1, 2 и 3 (контрольный номер 222, серийный номер 587) производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН (Москва), одна доза которой составляет 0,2 мл и содержит не менее 1000000 инфекционных единиц полиовируса 1-го типа, не менее 100000 — 2-го и не менее 300000 — 3-го.

Животные. Использовали кроликов породы Шиншилла массой 2,5—3,0 кг, а также белых беспородных мышей массой 18—20 г.

Способ выделения нейраминидазы из *S. aureus* 392. В качестве продуцента использовали выделенный от больного штамм *S. aureus* 392 с высокой антинейраминидазной активностью [10].

Очистка на сефарозе 4В. Образец препарата насливали на колонку (2,2 × 60 см) с сефарозой 4В, уравновешенную 0,1 М раствором уксуснокислого аммония. Собирали фракции по 2,5 мл и

анализировали содержание белков по методу Лоури [13], углеводов — по реакции с фенолом и серной кислотой [14]. Чистоту препарата проверяли методом анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонках HPLC фирмы «Векшан» (США) типа TSK DEAE-5P размерами 7,5 × 75 мм.

Аминокислоты и гексозамины определяли на автоматическом анализаторе RLA-5 («Hitachi», Япония) после гидролиза 6 н HCl (20 ч, 110 °С). Моносахаридный состав ингибитора определяли после кислотного гидролиза в 2 н HCl (20 ч, 100 °С) методом бумажной хроматографии в системе растворителей бутанол:пиридин:вода (6:4:3), используя в качестве проявителей кислый фталат анилина, щелочной раствор азотнокислого серебра, спиртовой раствор нингидрина [15]; применена также газожидкостная хроматография на приборе марки Цвет-100 (Россия).

Получение гипериммунных сывороток против нейрамининов. Кролики породы Шиншилла иммунизировали очищенными препаратами НИ *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *B. subtilis* 105 в дозе 1 мг/мл по 0,2 мл в третье веко. Повторную иммунизацию осуществляли через 1 месяц. Через 2 недели после последней иммунизации сыворотки собирали и определяли в них антитела к НИ методом иммуноферментного анализа (ИФА) [16].

Вакцинация. Эффективность вакцинации исследовали с помощью НИ бактерий на кроликах. Для опытов брали четыре группы животных, которым внутримышечно вводили различные адьюванты в дозе 100 мкг в 0,1 мл с гриппозной вакциной Agrippol в дозе 9 мкг в 0,1 мл: 1-я группа — иммунизацию проводили гриппозной вакциной Agrippol; 2-я группа — комбинированное введение НИ *S. aureus* (0,1 мл) и вакцины Agrippol; 3-я группа — введение НИ *S. pneumoniae* (100 мкг) и вакцины Agrippol; 4-я группа — введение НИ *B. subtilis* (100 мкг) и вакцины Agrippol.

Для иммунизации животных использовали также ОПВ из штаммов Себина типов 1, 2 и 3. В опытах использовали четыре группы животных по пять в каждой. В 1-ю группу входили животные, которым вводили только ОПВ, во 2-ю — вакцину вводили вместе с НИ *S. aureus*, в 3-ю — только НИ *S. aureus*, в 4-ю — животные, не получавшие ни ОПВ, ни НИ. Кроликам вакцину вводили одновременно внутривенно в крайнюю ушную вену (по 0,75 мл) и внутривенно (по 0,75 мл) в нижнюю часть живота. Животные 2-й группы получали вакцину и НИ в одном шприце в равных объемах. Кровь брали из ушной вены. Для определения титра вируснейтрализующих противопололио-

миелитных антител кровь отбирали до иммунизации и на 3, 5, 7, 15 и 30-е сут после иммунизации.

Уровни вируснейтрализующих антител против полиовирусов определяли в реакции микронеutralизации в перевиваемой линии клеток Нер-2 в соответствии с методикой [17].

Иммуногенность вакцины. Мышам интраназально вводили вакцину Agrippol (9 мкг), вакцину с НИ *B. subtilis* (200 мкг) и адьювант *B. subtilis* без вакцины (200 мкг); контрольной группе вводили физиологический раствор (0,2 мл).

Через 7 дней после вакцинации мышей заражали вирусом гриппа А/Шандонг/9/93/Н₃Н₂. Затем в течение 14 дней учитывали гибель мышей.

Для дифференциации антител по коэффициенту седиментации (19S и 7S, что условно соответствует IgM и IgG) использовали β-меркаптоэтанол (β-МЕ) фирмы «Merck» (ФРГ). К 0,2 мл сыворотки добавляли равный объем 0,2 М β-МЕ, инкубировали 18 ч при температуре 4 °С.

Серологические исследования. Титры антигемагглютининов в сыворотках кроликов определяли в РТГА (реакция торможения геагглютинации) с антигенами вирусов, входящих в состав вакцины Agrippol. Перед постановкой РТГА сыворотки прогревали при температуре 56 °С в течение 30 мин.

Для решения вопроса о значимости полученных показателей и определения достоверности отличий между ними результаты обрабатывали статистически. Тенденции уровней вируснейтрализующих антител против полиомиелита определяли с помощью компьютерной программы «Tendentia».

Результаты и обсуждение. *Характеристика бактериальных адьювантов — НИ S. aureus, S. pneumoniae, B. subtilis 105.* Нами выделено вещество, продуцируемое клетками бактерий, по химической структуре представляющее углеводсодержащий биополимер. Изучение химического состава ингибитора показало, что соотношение белка и углеводов составляет 1:10 для *S. aureus*, 1:6 — для *S. pneumoniae*, 1:0 — для *B. subtilis* 105. Исследование моносахаридного состава углеводсодержащих биополимеров бактерий показало, что основным нейтральным моносахаридом является манноза, глюкоза содержится в меньшем количестве; соотношение этих сахаров составило 24:1 для *S. aureus* и 6:1 — для *S. pneumoniae*; НИ *B. subtilis* 105 не содержит моносахаридного компонента.

Кроме того, в НИ *S. aureus*, *S. pneumoniae* и *B. subtilis* 105 идентифицированы два гексозамина — галактозамин и глюкозамин в соотношении 1:3,5; 1:2,85 и 5:1 соответственно.

Сравнительный анализ аминокислотного состава НИ *S. pneumoniae* и *S. aureus* свидетельствует о

Таблица 1
Аминокислотный состав нейрамининов (% к сухой массе)

Аминокислота	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Лизин	2,0	0,51	—
Гистидин	Следы	Следы	—
Аргинин	0,8	—	—
Аспарагиновая кислота	Следы	0,81	1,7
Треонин	0,72	1,31	1,7
Серин	1,04	0,9	1,7
Глутаминовая кислота	8,0	1,26	—
Пролин	Следы	0,16	—
Глицин	1,6	0,8	2,9
Аланин	4,0	1,12	—
Цистеин	—	—	—
Валин	0,56	0,42	—
Метионин	—	—	—
Лейцин	2,0	0,27	—
Изолейцин	0,24	0,48	—
Тирозин	0,2	Следы	—
Фенилаланин	0,112	0,95	—

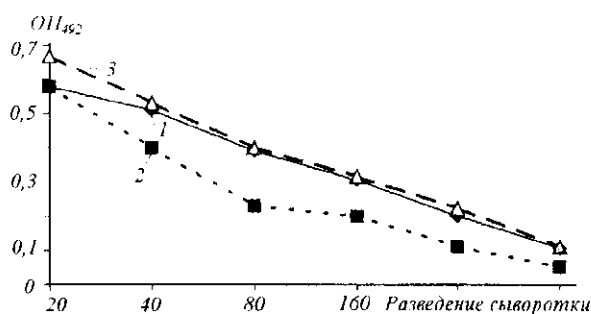


Рис. 1. Взаимодействие нейрамининов (НИ) *S. aureus* (1), *S. pneumoniae* 1-го типа (2) *B. subtilis* 105 (3) с сывороткой против НИ *B. subtilis* 105

присутствии в этих препаратах почти полного набора аминокислот, за исключением цистеина и метионина у *S. pneumoniae* и цистеина и аргинина у *S. aureus*. Препарат *B. subtilis* 105 содержит четыре аминокислоты (табл. 1).

Препараты, выделенные из культуральной среды *S. aureus*, *S. pneumoniae* и *B. subtilis*, отличались по химическому составу как количественно, так и качественно. Методом ИФА с гипериммунными сыворотками к этим препаратам показано анти-

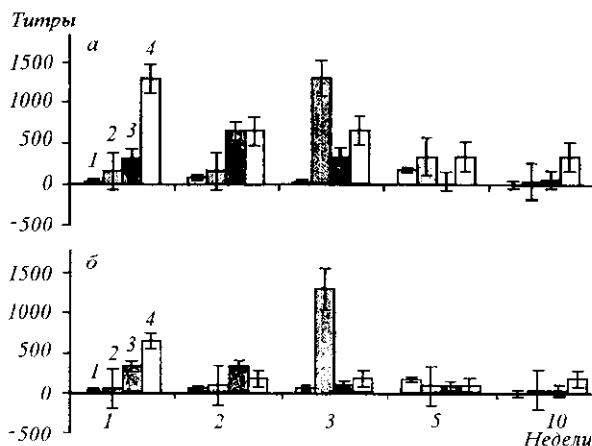


Рис. 2. Уровень антител к вирусу гриппа А/Шан-донг/9/93/Н₃Н₂/ в отсутствие β-меркаптоэтанола (а) и в его присутствии (б): 1 — вакцина; 2 — вакцина + нейраминин (НИ) *Pneumococcus*; 3 — вакцина + НИ *S. aureus*; 4 — вакцина + *B. subtilis*

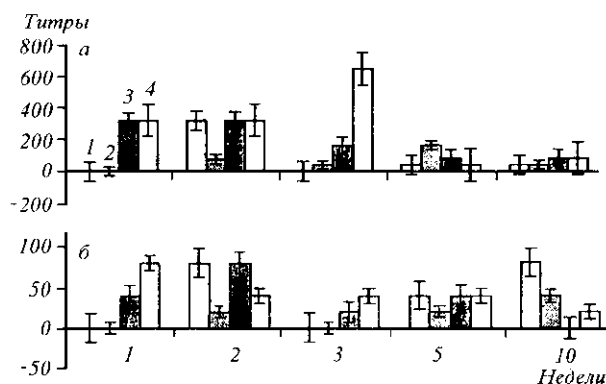


Рис. 3. Уровень антител к вирусу гриппа А/Сингапур/6/86/Н₁Н₁/: 1 — вакцина; 2 — вакцина + нейраминин (НИ) *Pneumococcus*; 3 — вакцина + НИ *S. aureus*; 4 — вакцина + *B. subtilis*

генное родство между изучаемыми углеводсодержащими биополимерами по пептидному компоненту с молекулярной массой 17 кДа (рис. 1).

Изучение влияния нейрамининов на уровень антител при вакцинации против гриппа. Исследование эффективности вакцинации с использованием НИ проводили на кроликах, как описано в разделе «Материалы и методы». Для исследования уровня антител против вирусов гриппа типа А в сыворотках крови опытных и контрольных кроликов в реакции торможения гемагглютинации применяли диагностические вирусы гриппа А/Шан-донг/9/93/Н₃Н₂/ и А/Сингапур/6/86/Н₁Н₁/. На рис. 2 и 3 представлены результаты влияния ней-

Таблица 2

Защита мышей от гриппозной инфекции при вакцинации с адъювантом — нейраминином *B. subtilis* 105

Группа мышей	Количество падших мышей	Летальность, %	Коэффициент защиты	Индекс эффективности
1-я — физиологической раствор	7	70	—	—
2-я — вакцина	4	40	1,75	42,85
3-я — вакцина + адъювант	2	20	3,5	71,43
4-я — адъювант	5	50	1,4	28,5

Примечание. Во всех группах заражали по 10 мышей.

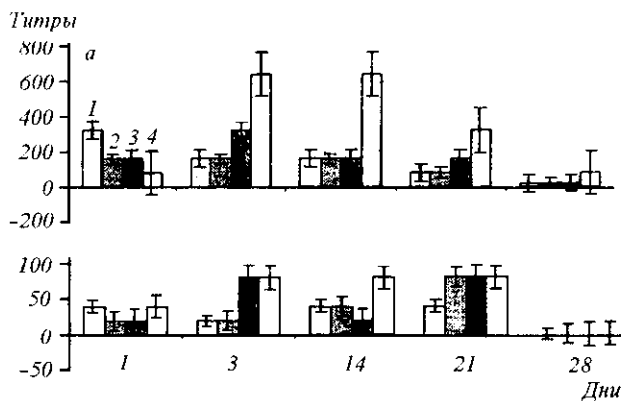


Рис. 4. Уровень антигемагглютининов к вирусу гриппа А/Шандонг/9/93/Н₃Н₂/ при дополнительной иммунизации через 4 месяца нейраминином (НИ) *B. subtilis* 105: 1 — вакцина; 2 — вакцина + НИ *Pneumococcus*; 3 — вакцина + НИ *S. aureus*; 4 — вакцина + *B. subtilis*

рамининов на уровень антигемагглютининов при использовании вакцины Agrippol.

Отмечается двухволновая динамика синтеза антигемагглютининов против гемагглютининов вирусов гриппа А/Шандонг/9/93/Н₃Н₂/ и А/Сингапур/6/86/Н₁Н₁/, снижение титров антигемагглютининов к НЗ и Н1 на 3-й неделе (1:20,0) соответственно.

В опытных группах образование специфических антител зависит от применяемого нейрамина. НИ *S. aureus* стимулирует раннее образование антигемагглютининов к НЗ и их появление уже на первой неделе, нарастание титров к 3-й неделе до уровня 1:1280 ($p \leq 0,05$), причем за счет иммуноглобулинов класса IgG, и постепенное уменьшение их уровня к 10-й неделе. На синтез антигемагглютининов к Н1 НИ *S. aureus* не действует. НИ *S. pneumoniae* усиливает синтез антигемагглютининов к обеим субъединицам НЗ и Н1 вакцины

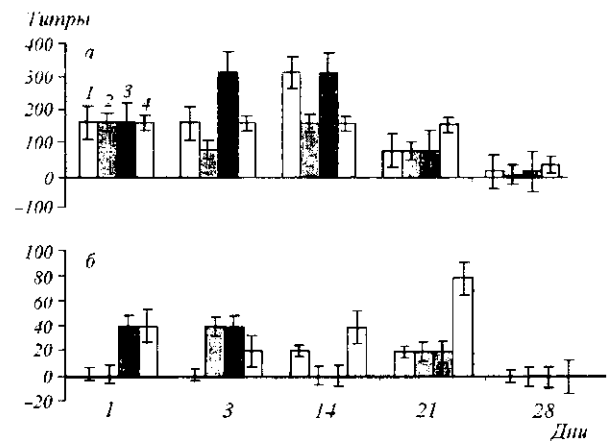


Рис. 5. Уровень антигемагглютининов к вирусу гриппа А/Сингапур/6/86/Н₁Н₁/ при дополнительной иммунизации через 4 месяца нейраминином (НИ) *B. subtilis* 105: 1 — вакцина; 2 — вакцина + НИ *Pneumococcus*; 3 — вакцина + НИ *S. aureus*; 4 — вакцина + *B. subtilis*

($p \leq 0,05$); при этом наблюдается ранний синтез IgG, их выявление в течение 3 недель и значительное снижение к 5-й неделе.

Адъювант НИ *B. subtilis* 105 оказывает наиболее выраженный эффект — ранний синтез IgG ($p \leq 0,05$) на первой неделе, их высокий уровень в течение 10 недель. Следует отметить, что НИ более эффективны при стимуляции антител к гемагглютинуину НЗ. Через 3 месяца, когда титры антигемагглютининов во всех группах, кроме последней, значительно снизились, всем кроликам внутримышечно был введен адъювант НИ *B. subtilis* 105 в дозе 100 мкг без вакцины. Динамика синтеза антигемагглютининов к обеим субъединицам НЗ и Н1 вакцины в течение 28 сут представлена на рис. 4 и 5.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что субъединичная вакцина Agrippol стимулирует образование специфических антигемаг-

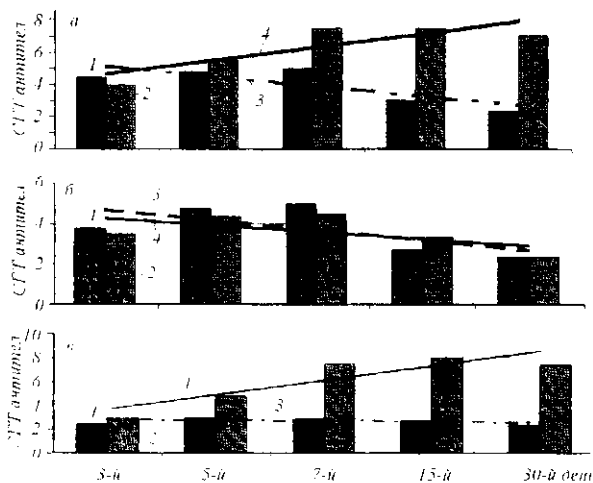


Рис. 6. Среднегеометрические титры (СГТ) антител к полиовирусу типов 1 (а), 2 (б) и 3 (в) у кроликов в зависимости от времени, прошедшего после иммунизации: 1 — оральной полиомиелитной вакциной (ОПВ); 2 — ОПВ + нейраминины; 3, 4 — то же, что 1, 2 в линейном представлении

глютенинов НЗ и Н1 в невысоких титрах—1:80—1:160, начиная со второй недели после вакцинации. Сохранение одинакового уровня иммунного ответа при однократной иммунизации наблюдалось при титрах 1:40—1:160 в течение пяти недель, к 10-й неделе после вакцинации антигемагглютинины к НЗ и Н1 не определялись. Специфические иммуноглобулины появлялись со второй недели и их можно было определить для вирусов гриппа А/Шандонг/9/93/Н₃Н₂/ до пятой недели, для вирусов А/Сингапур/6/86/Н₁Н₁/ в невысоких титрах — до 10-й недели.

Изучение влияния НИ S. aureus на уровень антител при вакцинации против полиомиелита. При исследовании сывороток крови у кроликов всех групп перед иммунизацией антител к полиовирусам типа 1, 2 и 3 не выявлено. У животных 3-й и 4-й групп антитела к полиовирусам не обнаружены на протяжении всего эксперимента.

В 1-й группе животных, которых иммунизировали только ОПВ, среднегеометрические титры (СГТ) антител к полиовирусам трех типов имели максимальное значение на 7-е сут исследования (соответственно 1:5,0; 1:5,0 и 1:2,8). На 15-е сут наблюдалось их снижение и на 30-е — эти показатели имели одинаковые значения для всех типов вирусов (1:2,3).

В группе животных, которым одновременно вводили ОПВ и НИ *S. aureus*, СГТ антител к полиовирусам типов 1 и 3 на 7-е сут были значи-

тельно выше по сравнению с группой, получавшей только ОПВ (соответственно в 1,5 и 2,7 раза), и их значения оставались высокими на протяжении всего периода исследования ($p < 0,01$) (рис. 6, а, в).

К полиовирусу типа 2 СГТ антител на протяжении всего периода наблюдения в 1-й и 2-й группах имели близкие значения (рис. 6, б).

Учитывая то, что наиболее эффективным в опытах с вирусом гриппа был НИ *B. subtilis* 105, он и был выбран для изучения защитного действия вакцинации на мышах. В опыт брали четыре группы мышей по 10 животных в каждой. 1-й группе мышей интраназально вводили 0,1 мл вакцины, 2-й — вакцину с НИ *B. subtilis* 105, 3-й — НИ *B. subtilis* 105 без вакцины и 4-й — физиологический раствор. Через 7 сут мышам заражали адаптированным к мышам вирусом гриппа А/Шандонг/9/93/Н₃Н₂/ в дозе 1 LD₅₀. Затем в течение 14 дней учитывали падеж животных. Данные представлены в табл. 2.

В результате проведенных исследований показано, что защита мышам от гриппозной инфекции наиболее выражена при вакцинации мышам за одну неделю перед заражением вакциной Agripol совместно с НИ *B. subtilis* 105 (индекс эффективности (ИЭ) = 71,43), менее выражена она при вакцинации одной вакциной (ИЭ = 42,85). Как следует из данных табл. 2, защита от гриппозной инфекции наблюдается также при введении одного только НИ *B. subtilis* 105 (ИЭ = 28,5).

Выводы. Мы сравнили адьювантную активность нейрамининов из бактерий по их способности влиять на иммунный ответ при вакцинации вирусами гриппа и полиомиелита.

Бактериальные адьюванты являются биополимерами, состоящими из пептида, гексозаминов и иногда — углеводного компонента. Они получены из среды культивирования бактерий.

Сравнительный анализ эффективности адьювантов проведен между НИ *S. aureus*, *S. pneumoniae* и *B. subtilis* 105. Известные к настоящему моменту бактериальные адьюванты, используемые при иммунизации, стимулируют гуморальный и секреторный иммунитет.

Предложенные нами бактериальные адьюванты НИ *S. aureus*, *S. pneumoniae* и *B. subtilis* 105 не только стимулируют гуморальный иммунитет, значительно увеличивая титры антигемагглютининов класса IgG, но и способствуют более раннему появлению (на первой неделе) наряду с IgM также IgG. Такая закономерность — стимуляция специфических IgG на первой неделе после введения — вызывает иммунный ответ по вторичному типу, т. е. на известный организму антиген, что, по-види-

тому, связано с пептидной мимикрией нейрамининов и гемагглютининов вирусов гриппа [18].

Пептидная мимикрия может быть использована для праймирования и увеличения длительности иммунного ответа после бустер-иммунизации. Так как мимикрирующие пептиды способны антиген-специфически стимулировать Т-хелперы, явление пептидной мимикрии может быть использовано для адьювантной терапии.

Появление IgG на первой неделе при вакцинации с НИ *S. aureus*, *S. pneumoniae* и *B. subtilis* 105 может быть связано не только с мимикрией и гемагглютинином вируса гриппа, но и, по-видимому, с одним из фрагментов иммуноглобулина, что может объяснить выявленную нами закономерность — формирование иммунного ответа по вторичному типу при иммунизации гриппозной вакциной с НИ *S. aureus*, *S. pneumoniae* и особенно *B. subtilis* 105. Эффективность применения новых бактериальных адьювантов подтвердили эксперименты по иммунизации вакциной с НИ и последующим заражением вирусом гриппа.

В эксперименте на животных показано, что НИ *S. aureus* стимулирует более продолжительную выработку антител в высоких титрах к полиовирусам типов 1 и 3, что свидетельствует о его адьювантных свойствах для полиомиелитной вакцины.

В заключение следует отметить, что НИ *S. aureus*, *S. pneumoniae* и *B. subtilis* проявляют адьювантные свойства и могут быть использованы для усиления антительного ответа при вакцинации. Особенно это относится к НИ *B. subtilis* 105. Новые бактериальные адьюванты, подобно мимикрирующим пептидам, способствуют усилению гуморального и защитного эффекта вакцинации в ранние сроки. Нейраминины нетоксичны, поэтому перспективны как новый препарат для адьювантной терапии.

S. L. Rybalko, M. L. Khristova, A. V. Shapiro, L. D. Varbanets, N. L. Zubkova, V. I. Zadorozhna, N. V. Ivans'ka, I. B. Sorokulova, T. F. Grytsak, T. M. Furzikova, I. I. Pinchuk, Yu. V. Patskovski, S. T. Diadiun, V. V. Smirnov, M. A. Urdaci

Usage of new bacterial adjuvants for vaccination by anti-influenza and anti-poliomyelitis vaccines

Summary

The authors have compared activities of three bacterial adjuvant-neuraminins isolated from culture fluids of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis* 105 taking into consideration their influence on the immune response following anti-influenza and anti-poliomyelitis vaccination. Bacterial adjuvants stimulate humoral immune response and help to develop more early anti-influenza IgG together with IgM antibodies (on the first week of immunization). This phenomenon may be due to the peptide mimicry of neuraminins and influenza virus hemagglutinins. In an animal model the *S. aureus* neuraminin is shown to stimulate a

more prolonged antibody synthesis against polioviruses types 1 and 3. Due to such mimicry, neuraminins may be used for priming and acceleration of prolonged immune answer following booster immunization. Being non-toxic, neuraminins are promising compounds for the adjuvant therapy.

S. L. Rybalko, M. L. Khristova, A. V. Shapiro, L. D. Varbanets, N. L. Zubkova, V. I. Zadorozhna, N. V. Ivans'ka, I. B. Sorokulova, T. F. Grytsak, T. M. Furzikova, I. I. Pinchuk, Yu. V. Patskovskiy, S. T. Dядюн, V. V. Smirnov, M. A. Urdaci

Використання нових бактерійних ад'ювантів при вакцинації проти грипу та поліомієліту

Резюме

Порівнювали активність бактерійних ад'ювантів — нейрамінінів, виділених з культуральних середовищ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* і *Bacillus subtilis* 105, за їхньою здатністю впливати на імунну відповідь при вакцинації вірусом грипу та поліомієліту. Бактерійні ад'юванти стимулюють гуморальний імунітет та сприяють більш ранній появі (на першому тижні імунізації) поряд з IgM і IgG. Таке явище пов'язане, мабуть, з пептидною мимікрією нейрамінінів та гемагглютининів вірусів грипу. В експерименті на тваринах показано, що нейрамінін *S. aureus* стимулює триваліший синтез антитіл у високих титрах проти поліовірусів типів 1 та 3. Пептидну мимікрію можна використати для праймування та посилення тривалості імунної відповіді після бустер-імунізації. Нейрамініни нетоксичні, а тому вони перспективні як нові препарати при ад'ювантній терапії.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Edelman R. Vaccine adjuvants Rev // Infect. Dis.—1980.—2.—P. 370—383.
2. Gupta R. K., Relyveld E. H., Lindblad E. B., Bizzini B., Ben-Efraim S., Gupta C. K. Adjuvant — a balance between toxicity and adjuvanticity // Vaccine.—1993.—11, N 3.—P. 293—306.
3. Schultz N., Oratz R., Chen D., Zeleniuch A., Jacquatte T., Abeles G., Bystry J. C. Effect of Detox as an adjuvant for melanoma vaccine // Vaccine.—1995.—13, N 5.—P. 503—508.
4. Bergquist C., Lagerdard T., Holmgren J. Antibody responses in serum and lung to intranasal immunization with *Haemophilus influenzae* type B polysaccharide conjugated to cholera toxin B subunit and tetanus toxoid // Acta pathol., microbiol. et immunol. scand.—1998.—106, N 8.—P. 800—806.
5. Freytag L. C., Clement J. D. Bacterial toxins as mucosal adjuvants // Curr. Top. Microbiol. Immunol.—1999.—236.—P. 215—236.
6. Pouwels P. H., Leer R. J., Shaw M., Hejne den Bak-Glathouwer M. J. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes // Int. J. Food Microbiol.—1998.—41, N 2.—P. 155—167.
7. Verweij W. R., de Haan L., Holtrop M., Agsteribbl E., Brands R. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen // Vaccine.—1998.—16, N 20.—P. 2069—2076.
8. Bessler W. G., Huber M., Baier M. Bacterial cell wall components as immunomodulators-II. The bacterial cell wall extract OM-85 BV as unspecific activator, immunogene and adjuvant in mice // Int. J. Immunopharmacol.—1997.—19, N 19—20.—P. 551—558.

9. *Medina E., Talay S. R., Chhatwal G. S., Guzman C. A.* Fibronectin-binding protein 1 of *Streptococcus pyogenes* is a promising adjuvant for antigens delivered by mucosal route // *Eur. J. Immunol.*—1998.—28, N 3.—P. 1069—1077.
10. А. с. № 924949. Способ получения ингибитора нейраминидазы / А. Ф. Фролов, А. В. Шапиро, С. Л. Рыбалко // Оpubл. 04.10.1982.
11. *Lin W., Kunio O., Ko A.* Isolation, purification and chemical properties of neuraminidase inhibitors. 289 // *Agr. Biol. Chem.*—1975.—39, N 5.—P. 923—930.
12. *Зубкова Н. Л., Рыбалко С. Л., Задорожна В. І., Шапиро А. В.* Вивчення впливу нейрамініну на репродукцію поліовірусів у перешейовальній клітинній культурі НЕР-2 // *Лаб. діагностика.*—2002. —№ 1.—С. 36—38.
13. *Lowry O. H., Rosenborough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with Folin reagent // *J. Biol. Chem.*—1951.—193.—P. 265—275.
14. *Dubois M., Gilles H. Y.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.*—1956.—28, N 2.—P. 350—353.
15. *Захарова И. Ю., Косенко Л. В.* Методы микробиологических полисахаридных исследований.—Киев: Наук. думка, 1982.—189 с.
16. *Voller A., Bidwell D. E., Bartlett A.* A guide with abstracts of microplate applications // *Dynatech Europe: Guernsey.*—1979.—183 p.
17. *Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита* // Глобал. прогр. по вакцинологии и иммунологии ВОЗ.—Женева; Москва, 1998. —45 с.
18. *Рыбалко С. Л., Шапиро А. В., Сорокулова И. Б.* Антигенная мимикрия пептидов бактерий и вирусов в конструировании вакцин // III Междунар. конф. по соврем. вакцинологии (Киев, 3—6 мая 1998 г.)—Киев, 1998.—С. 10.

УДК 616.921.5 + 006/65.011.8
Надано до редакції 16.01.02