

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ АДЬЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ ХИТОЗАНА В КОМПЛЕКСЕ С РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ F НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ И РЕКОМБИНАНТНЫМ АНАТОКСИНОМ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

А.А. Калошин*, Н.А. Михайлова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова
105064, Москва, Малый Казенный переулок, 5А; *e-mail: alex-k-1973@yandex.ru

Целью исследования было изучение адъювантных свойств хитозана в сравнении с гидроксидом алюминия при иммунизации рекомбинантными белками *Pseudomonas aeruginosa*. В работе использовали рекомбинантный белок F наружной мембраны (OprF) и рекомбинантный анатоксин *P. aeruginosa*, к которым добавляли 0.5% препарат хитозана, растворенный в глутаминовой кислоте с pH 5.0 или гель гидроксида алюминия. Испытали соотношение гидроксида алюминия к белку 3:1 и 1:1, а хитозан добавляли в количестве 100 мкг и 50 мкг для одной иммунизирующей дозы. При иммунизации препараты вводили мышам внутрибрюшинно двукратно с двухнедельным интервалом, а затем через две недели животных заражали внутрибрюшинно *P. aeruginosa* (PA-103), подсчитывая погибших и выживших животных. Иммунизация рекомбинантным белком OprF в дозе 25 мкг и рекомбинантным анатоксином в дозе 50 мкг как с гидроксидом алюминия, так и с хитозаном, способствовала развитию равнозначных протективных свойств. При комплексном введении двух рекомбинантных белков было выявлено усиление защитных свойств с использованием обоих адъювантов. Исследовали возможность применения рекомбинантных антигенов без адъюванта и уменьшения их иммунизирующей дозы при бустерной иммунизации. Снижение иммунизирующей дозы в два раза при повторном введении не уменьшило протективный эффект, а в случае хитозана, приводило к усилению иммунного ответа при бустерной иммунизации рекомбинантными антигенами без адъюванта. Таким образом, для рекомбинантных белков *P. aeruginosa* выявлены адъювантные свойства хитозана, не уступающие по индукции протективных свойств гидроксиду алюминия.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; хитозан; адъювант; белок F наружной мембраны (OprF); экзотоксин A; анатоксин

DOI: 10.18097/BMCRM00252

ВВЕДЕНИЕ

Pseudomonas aeruginosa – один из наиболее серьезных возбудителей оппортунистических инфекций, характеризующийся высокой способностью к быстрому развитию резистентности к антибиотикам. Активная иммунопрофилактика *P. aeruginosa* у пациентов из группы риска рассматривается как возможный путь контроля синегнойной инфекции. В Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (НИИВС им. И.И. Мечникова) получен ряд рекомбинантных белков, по результатам изучения иммунобиологических свойств которых создана рекомбинантная вакцина синегнойная (PBC), успешно прошедшая доклинические исследования [2].

Известно, что рекомбинантные белки обладают низкой иммуногенностью, поэтому при создании вакцин на их основе большое внимание уделяют подбору адъювантов. В составе отечественных коммерческих вакцин, применяемых в настоящее время в практике здравоохранения, в качестве адъюванта для депонирования антигенов и стимуляции иммунного ответа используют гидроксид алюминия [3]. В частности, разработанная в НИИВС им. И.И. Мечникова вакцина PBC представляет собой комплекс рекомбинантного белка F наружной мембраны (OprF) и рекомбинантной делеционной формы экзотоксина A (анатоксин) *P. aeruginosa*, сорбированных на геле гидроксида алюминия

[2]. Выбор в пользу традиционного адъюванта продиктован длительностью опыта их использования в качестве компонента различных вакцин, который, однако, не лишен некоторых недостатков: слабо стимулирует клеточный иммунитет, вызывает нежелательные реакции в виде кожного раздражения, боли и воспаления в области инъекции. Кроме того, в последние годы появились сообщения о том, что многократное в течение жизни применение гидроксида алюминия может привести к развитию аллергических реакций и заболеваний центральной нервной системы [4, 5].

Поиск и разработка новых классов адъювантов является перспективным направлением современной иммунобиологии [5]. В последние годы возник серьезный интерес к исследованиям адъювантных свойств природного полисахарида – хитозана, который выделяют из панцирей ракообразных. Известно, что хитозан обладает иммуномодулирующими свойствами, необходимыми для адъювантов. Это подтверждено тем, что наночастицы хитозана и его производных, связанные с антигенами, способны эффективно активировать клеточное и гуморальное звенья иммунного ответа [6]. Под термином «адъювант на основе хитозана» понимается не только обширная группа субстанций, представляющих собой хитозаны, отличающиеся по основным характеристикам (молекулярной массе, степени дезацетилирования и индексу полидисперсности), но и препараты на их основе в различном физическом состоянии (гели, микрочастицы и наночастицы),



а также производные хитозана и комплексные адъюванты на его основе [6-8]. Установлена эффективность хитозана, использованного в качестве адъюванта при парентеральном введении инактивированных гриппозных вакцин [9-11].

Целью настоящего исследования было изучение адъювантных свойств хитозана при иммунизации рекомбинантными белками *P. aeruginosa* (OprF и анатоксин).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе использованы следующие реагенты: антибиотики ампициллин и канамицин сульфат («Синтез», Россия); бактотриптон и бактодрожжевой экстракт («Difco», США); изопропил-β-D-тиогалактопиранозид («Thermo Fisher Scientific», США); Ni-сефароза («GE Healthcare», Швеция); гель гидроксида алюминия («Sigma-Aldrich», США); остальные химические реактивы были приобретены у «Amresco» (США); 0.5 % препарат хитозана растворенный в глутаминовой кислоте с pH 5.0 [11] любезно предоставлен Юрием Михайловичем Васильевым (лаборатория генетики РНК-содержащих вирусов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова).

Бактериальные штаммы

Для синтеза рекомбинантных белков использовали *Escherichia coli* штаммы-продуценты рекомбинантного белка OprF [12] и рекомбинантного анатоксина [13] из коллекции лаборатории протективных антигенов НИИВС имени И.И. Мечникова. Для экспериментального инфицирования животных использовали вирулентную культуру *P. aeruginosa* PA-103 (ATCC29260).

Лабораторные животные

Для иммунизации использовали самок белых мышей весом 16-18 г из Филиала «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России.

Получение рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина

Синтез рекомбинантных белков с использованием соответствующих штаммов продуцентов осуществляли, как описано ранее [2]. Рекомбинантные белки выделяли из биомассы с использованием ранее разработанных оригинальных методов двухстадийной очистки. На первой стадии в случае рекомбинантного белка OprF получали «гидрофобную фракцию» бактериальных белков, а в случае рекомбинантного анатоксина выделяли тельца-включения. На второй стадии рекомбинантные белки очищали методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы в 8 М буферном растворе мочевины с последующим диализом против 50 mM буферного раствора Tris-HCl (pH 9.0) [2].

Электрофорез белков

Анализ полученных белковых продуктов осуществляли в 12 % полиакриламидном геле по методу Лэммли [14].

Иммунизация мышей

Мышей иммунизировали внутрибрюшинно (в/бр) в объеме вводимого препарата 0.5 мл. Для достижения заданных доз препараты рекомбинантных белков разводили физиологическим раствором хлорида натрия до требуемой концентрации. Предварительно к препаратам рекомбинантных белков добавляли соответствующее количество адъювантов. Препарат хитозан использовали в дозах 100 мкг и 50 мкг, добавляя его непосредственно перед иммунизацией. При использовании гидроксида алюминия, его препарат добавляли к рекомбинантным белкам в весовом соотношении 3:1 и 1:1, а затем полученные препараты инкубировали в течение 12-14 ч при температуре 4°C для адсорбции антигенов на адъюванте.

Проводили две иммунизации с интервалом две недели. В качестве контрольных животных использовали неиммунизированных мышей той же партии. Экспериментальное инфицирование *P. aeruginosa* осуществляли через две недели после второй иммунизации.

Экспериментальное инфицирование *P. aeruginosa*

При экспериментальном инфицировании животных внутрибрюшинно вводили различные дозы живой вирулентной культуры *P. aeruginosa* в объеме 0.5 мл, как описано ранее [2]. Иммунизированным мышам вводили 200 млн, 50 млн и 12.5 млн микробных клеток (м.к.), а мышам контрольных групп – 100 млн, 25 млн и 6.25 млн м.к.

Подсчет погибших и выживших особей проводили в течение семи дней, с последующим определением ЛД₅₀. Это значение вычисляли по модифицированной формуле Кербера в модификации Ашмарина – Воробьева [15], согласно которой ЛД₅₀ соответствует обратному логарифму $[\lg A - \lg 2 \times (V_1/C_1 + V_2/C_2 + V_3/C_3 - 0.5)]$; где А – максимальная инфекционная доза в опыте, В – количество животных, павших в группе, С – первоначальное количество животных в группе. Затем определяли индексы эффективности защитных свойств, которые представляли отношение значений ЛД₅₀ в опытных группах к значениям ЛД₅₀ в контрольных группах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе исследованы адъювантные свойства хитозана в сочетании с рекомбинантным белком OprF и рекомбинантным анатоксином в оптимальных иммунизирующих дозах: 25 мкг для OprF и 50 мкг для анатоксина. При этом рекомбинантные белки использовали как по отдельности, так и в комплексе. Хитозан для экспериментов растворяли до 0.5% в глутаминовой кислоте с pH 5.0 и использовали в дозе 100 мкг на одну иммунизацию. Схема иммунизации включала два в/бр введения с двухнедельным интервалом. В качестве референс-препаратов использовали рекомбинантные белки (только OprF, только анатоксин и комплекс двух белков), которые также сорбировали на геле гидроксида алюминия в соотношении к адъюванту 1:3.

В группах животных, иммунизированных рекомбинантным белком OprF, значения ЛД₅₀ составили: 61.6 млн м.к. для варианта с использованием гидроксида алюминия и 63.0 млн м.к. для препарата с хитозаном. Индексы эффективности защитных свойств соответствовали 1.9 для обеих опытных групп. При иммунизации рекомбинантным

Таблица 1. Защитные свойства рекомбинантных белков *P. aeruginosa* при использовании в качестве адъюванта гидроксида алюминия и хитозана.

Рекомбинантные белки в дозе (мкг)	Адъювант в дозе (мкг)	Доза заражения (млн м.к.)	Количество мышей павших/выживших	ЛД ₅₀ (млн м.к.)	ИЭ*
OprF 25	гидроксид алюминия 75	200	10/0	61.6	1.9
		50	3/9		
		12.5	1/9		
анатоксин 50	гидроксид алюминия 150	200	9/1	72.4	2.2
		50	5/10		
		12.5	0/10		
OprF 25 анатоксин 50	гидроксид алюминия 225	200	3/7	114.9	3.5
		50	3/12		
		12.5	0/10		
OprF 25	хитозан 100	200	8/2	63	1.9
		50	2/13		
		12.5	4/6		
анатоксин 50	хитозан 100	200	2/13	83.1	2.5
		50	2/9		
		12.5	3/7		
OprF 25 анатоксин 50	хитозан 100	200	7/3	104.7	3.2
		50	4/11		
		12.5	0/10		
неиммунизированные мыши		100	9/1	33	-
		25	4/6		
		6.25	0/10		

Примечание. *ИЭ – индекс эффективности защитных свойств

анатоксином значения ЛД₅₀ оказались примерно одинаковы: 72.4 млн м.к. в группе мышей, получавших препарат с гидроксидом алюминия и 83.1 млн м.к. в группе мышей, получавших препарат с хитозаном. Индексы эффективности защитных свойств препаратов на основе рекомбинантного анатоксина составили 2.2 и 2.5. При использовании комплекса двух рекомбинантных белков было отмечено усиление защитных свойств: индексы эффективности увеличивались до 3.5 при использовании гидроксида алюминия (ЛД₅₀ – 114.9 млн м.к.) и до 3.2 при использовании хитозана (ЛД₅₀ – 104.7 млн м.к.) (табл. 1).

На следующем этапе апробировали различные схемы иммунизации препаратами, в которых были снижены дозы хитозана и гидроксида алюминия. Хитозан использовали в дозе 50 мкг на одну инъекцию, а гель гидроксида алюминия добавляли в равном весовом соотношении к белку. Для первой иммунизации опытных животных разделили на четыре группы, которым вводили либо рекомбинантный белок OprF в дозе 25 мкг, либо рекомбинантный анатоксин в дозе 50 мкг, используя в составе препарата гидроксид алюминия или хитозан. Таким образом при первой иммунизации опытным группам мышей вводили: 1) рекомбинантный белок OprF с гидроксидом алюминия; 2) рекомбинантный анатоксин с гидроксидом алюминия; 3) рекомбинантный белок OprF с хитозаном; 4) рекомбинантный анатоксин с хитозаном. Через две недели после первой иммунизации каждая группа животных была разделена еще на три подгруппы; мыши этих подгрупп получали: 1) те же самые препараты, что и в первой иммунизации; 2) рекомбинантные белки в той

же дозе, что и в первой иммунизации, но без адъювантов; 3) препараты, используемые при первой иммунизации, но содержащие уменьшенные в два раза дозы. Таким образом после второй иммунизации опытные животные были разделены двенадцать опытных групп. В результате было выявлено, что выживаемость мышей, иммунизированных при использовании разных схем введения рекомбинантных антигенов, сорбированных на гидроксиде алюминия, была примерно одинакова. Индексы эффективности защитных свойств этих препаратов находились в пределах от 1.7 до 2.2. В то же время протективная активность рекомбинантных антигенов, вводимых в комплексе с хитозаном оказалась выше в группах животных, вторую (бустерную) иммунизацию которых проводили только белками. Индексы эффективности защитных свойств в этом случае составили 2.6 и 3.2 для рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина соответственно. Эффективность схем с использованием хитозана в дозе 50 мкг оказалась выше в сравнении с аналогичными препаратами, содержащими гидроксид алюминия (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В НИИВС им. И.И. Мечникова разработана вакцина РВС для профилактики синегнойной инфекции, представляющая собой комплекс рекомбинантных поринового белка OprF и анатоксина, сорбированных на гидроксиде алюминия [2]. В настоящей работе эти белки использовали при исследовании адъювантных

Таблица 2. Защитные свойства рекомбинантных белков *P. aeruginosa* с использованием разных количеств препаратов при второй иммунизации.

Белковый препарат в дозе (мкг) Адьювант в дозе (мкг)		Доза заражения (млн м.к.)	Количество мышей павших/выжив- ших	ЛД ₅₀ (млн м.к.)	ИЭ*	
Первая иммунизация	Вторая иммунизация					
OprF 25 гидроксид алюминия 25	OprF 25 гидроксид алюминия 25	200	10/1	32.2	2	
		50	6/5			
		12.5	4/7			
	OprF 25 -	OprF 25 -	200	10/2	35.4	2.2
			50	6/6		
			12.5	5/7		
	OprF 12.5 гидроксид алюминия 12.5	OprF 12.5 гидроксид алюминия 12.5	200	12/0	28.1	1.7
			50	8/4		
			12.5	3/9		
анатоксин 50 гидроксид алюминия 50	анатоксин 50 гидроксид алюминия 50	200	10/1	36.5	2.2	
		50	7/4			
		12.5	2/9			
	анатоксин 50 -	анатоксин 50 -	200	9/2	36.5	2.2
			50	8/3		
			12.5	2/9		
	анатоксин 25 гидрооксид алюминия 25	анатоксин 25 гидрооксид алюминия 25	200	11/1	35.4	2.2
			50	7/4		
			12.5	3/9		
OprF 25 хитозан 50	OprF 25 хитозан 50	200	9/2	36.5	2.2	
		50	5/6			
		12.5	5/6			
	OprF 25 -	OprF 25 -	200	8/2	42.9	2.6
			50	7/3		
			12.5	1/8		
	OprF 12.5 хитозан 50	OprF 12.5 хитозан 50	200	10/1	32.2	2
			50	8/3		
			12.5	2/9		
анатоксин 50 хитозан 50	анатоксин 50 хитозан 50	200	8/3	47	2.9	
		50	7/4			
		12.5	2/9			
	анатоксин 50 -	анатоксин 50 -	200	9/2	53.3	3.2
			50	4/7		
			12.5	3/8		
	анатоксин 50 хитозан 50	анатоксин 50 хитозан 50	200	8/3	47	2.9
			50	7/4		
			12.5	2/9		
неиммунизированные мыши		100	10/0	16.5	-	
		25	8/2			
		6.25	0/10			

Примечание. *ИЭ – индекс эффективности защитных свойств

свойств хитозана. На первом этапе получили и изучили препараты с использованием схемы и доз антигенов, используемых в составе вакцины РВС. В результате было обнаружено, что адьювантные свойства хитозана для рекомбинантных антигенов *P. aeruginosa* не уступали гидроксиду алюминия.

Ранее наблюдали подобный эффект хитозана, использованного в качестве адьюванта в составе гриппозных вакцин, в результате чего происходило существенное накопление IgG антител в организме экспериментальных животных [10]. Также подтвержден аддитивный эффект от использования двух рекомбинантных антигенов в

совместной иммунизации, что наблюдали при исследовании вакцины РВС [2].

Далее исследовали возможность использования адъювантов в более низких концентрациях и уменьшения иммунизирующей дозы при второй иммунизации антигенами без адъюванта. Снижение концентрации адъюванта в препаратах при бустерной иммунизации не уменьшало эффективности, а в случае хитозана происходило усиление иммунного ответа, при использовании рекомбинантных антигенов без адъюванта. Таким образом, выявлена возможность снижения концентрации адъювантов в препаратах без снижения эффективности защитных свойств иммунизации.

На основании полученных результатов подтверждена эффективность комплексной иммунизации рекомбинантными антигенами (OrgF и анатоксин) *P. aeruginosa*. Показана возможность применения хитозана в качестве адъюванта, поскольку препараты рекомбинантных белков с его использованием не уступали по индукции защитных свойств препаратам, сорбированных на гидроксиде алюминия.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Иммунизацию мышей осуществляли с соблюдением всех общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным. Все работы с животными проводили в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Юрию Михайловичу (лаборатория генетики РНК-содержащих вирусов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова) за предоставление препарата хитозана для проведения исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках НИР НИИВС им. И.И. Мечникова по теме «FGFS-2024-0010. Биотехнологические аспекты получения нативных и рекомбинантных антигенов, а также функционально-активных агентов условно-патогенных и пробиотических микроорганизмов, их роль в формировании адаптивного иммунитета» на период 2024–2026 гг.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lazareva, A.V., Tchebotar, I.V., Kryzhanovskaya, O.A., Tchebotar, V.I., Mayanskiy, N.A. (2015) *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and diseases. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya*, **17**(3), 170-186.
2. Kaloshin, A.A., Mihailova, N.A., Vasiliev, Y.M. (2021) Obtaining, evaluating of specific activity and authenticity of recombinant vaccine for prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infection and Immunity*, **11**(4), 763-770. DOI: 10.15789/2220-7619-OES-1369
3. Gupta, R.K., Siber, G.R. (1995) Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*, **13**(14), 1263-1276. DOI: 10.1016/0264-410x(95)00011-o
4. Tolstikov, G.A., Flekhter, O.B., Shults, E.E., Baltina, L.A., Tolstikov, A.G. (2005) Betulin and its derivatives. Chemistry and biological activity. *Chemistry for sustainable development*, **1**, 1-30.
5. Pashchenkov, M.V., Popilyuk, S.F., Alkhozova, B.I., L'vov, V.L., Fedenko, E.S., Khaitov, R.M., Pinegin, B.V. (2010) Immunobiological properties of muramylpeptide fragments of peptidoglycan from gram-negative bacteria. *Immunologiya*, **31**(3), 119-125.
6. Dmour, I., Islam, N. (2021) Recent advances on chitosan as an adjuvant for vaccine delivery. *Int. J. Biol. Macromol.*, **30**(200), 498-519. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.12.129
7. Varlamov, V.P., Il'ina, A.V., Shagdarova, B.Ts., Lunkov, A.P., Mysyakina, I.S. (2020) Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental and applied aspects. *Advances in biological chemistry*, **60**, 317-368.
8. Kurashova, S.S., Dzagurova, T.K., Ishmukhametov, A.A., Egorova, M.S., Balovneva, M.V., Sotskova, S.E., Tkachenko, E.A. (2018) Carbohydrate-based adjuvants for vaccine production. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, **18**(2), 81-91. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91
9. Vasiliev, Y.M. (2015) Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation. *Expert. Rev. Vaccines*, **14**(1), 37-53. DOI: 10.1586/14760584.2015.956729
10. Markushin S.G., Pereversev A.D., Koptiaeva I.B., Krivtsov G.G., Suchno A.S. (2010) Comparative investigation of adjuvant properties of different chitosan derivatives at mucosal vaccination by live and inactivated influenza vaccines. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*, **5**(54), 82-85.
11. Khantimirova, L.M., Vasilev, Yu.M., Kashirina, O.S., Chernikova, M.I., Kaloshin, A.A., Mikhajlova, N.A., Ilina, A.V., Lopatin, S.A., Varlamov, V.P. (2019) Immunoadjuvant composition for vaccines for infectious agents of viral and bacterial nature. Patent for invention RU 2697527 C1.
12. Kaloshin, A.A., Gatypova, E.V., Mikhailova, N.A. (2011) Obtaining recombinant forms of the outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* and assessment of their immunogenic properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **47**(8), 780-788. DOI: 10.1134/S0003683811080060
13. Kaloshin, A.A., Isakov, M.A., Mikhailova, N.A., Vertiev, Ju.V. (2013) Preparation of recombinant atoxic form of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **154**(3), 346-350. DOI: 10.1007/s10517-013-1947-1
14. Osterman, L.A. (1981) Research methods of proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifugation (practical guide). Moscow: Nauka, 288 p.
15. Ashmarin, I.P., Vorobyov, A.A. (1962) Statistical methods in microbiological research. Leningrad: Medgiz, 180 p.

Поступила: 10.10.2024

После доработки: 09.01.2025

Принята к публикации: 13.01.2025

STUDY OF THE ADJUVANT PROPERTIES OF CHITOSAN IN COMPLEX WITH RECOMBINANT OUTER MEMBRANE PROTEIN F AND RECOMBINANT TOXOID PSEUDOMONAS AERUGINOSA

A.A. Kaloshin, N.A. Mihailova*

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5a Maly Kazenny pereulok, Moscow, 105064 Russia; *e-mail: alex-k-1973@yandex.ru

The aim of the study was to investigate adjuvant properties of chitosan in comparison with aluminum hydroxide during immunization with recombinant proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. We used recombinant outer membrane protein F (OprF) and recombinant toxoid of *P. aeruginosa*, to which 0.5% chitosan preparation dissolved in glutamic acid with pH 5.0 or aluminum hydroxide gel were added. The ratios of aluminum hydroxide to protein of 3:1 and 1:1 were tested, and chitosan was added at 100 µg and 50 µg for one immunizing dose. The resulting preparations were administered to mice intraperitoneally twice with a two-week interval, and then two weeks later the animals were infected intraperitoneally with *P. aeruginosa* (PA-103). It was shown that double administration of the recombinant OprF protein at a dose of 25 µg and recombinant toxoid at a dose of 50 µg with both aluminum hydroxide and chitosan contributed to the development of equivalent protective properties. With the complex introduction of two recombinant proteins, an increase in protective properties was observed using both adjuvants. The possibility of using antigens without adjuvant and reducing their immunizing dose during booster immunization was investigated. It turned out that a two-fold reduction in the immunizing dose did not reduce the protective effect upon repeated administration, and in the case of chitosan, an increase in the immune response was observed during booster immunization with recombinant antigens without an adjuvant. Thus, for the recombinant proteins of *P. aeruginosa*, the adjuvant properties of chitosan were revealed. They are not inferior in the induction of protective properties to aluminum hydroxide.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; chitosan; adjuvant; outer membrane protein F (OprF); exotoxin A; toxoid

FUNDING

The research was conducted within the framework of a scientific project at the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera on the topic «FGFS-2024-0010: biotechnological aspects of obtaining native and recombinant antigens, as well as functionally active agents of opportunistic and probiotic microorganisms, their role in the formation of adaptive immunity» for the period from 2024 to 2026.

Received: 10.10.2024, revised: 09.01.2025, accepted: 13.01.2025