

М.Н. Киреев, Н.П. Гусева, Т.А. Полунина, А.Л. Кравцов, С.А. Бугоркова, Н.А. Шарапова,
Т.М. Тараненко

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА НА ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ЧУМНОГО МИКРОБА

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

Показано, что капсульный антиген F1 чумного микроба, конъюгированный с наночастицами коллоидного серебра (КС), обладает выраженным иммуногенным действием. При введении лабораторным животным он способен стимулировать выработку специфических антител при меньшей антигенной нагрузке, вызывать активацию генетического аппарата клеток иммунной системы, стимулировать гиперпластические процессы в лимфоидных органах. Растворы КС с антигенами стабильны, не вызывают общих и местных реакций, удобны в применении, что дает возможность их использования в иммунологической практике в качестве адъювантов.

Ключевые слова: капсульный антиген F1 *Yersinia pestis*, иммунобиологические свойства, адъювант

THE INFLUENCE OF COLLOID SILVER NANO-PARTICLES UPON IMMUNOBIOLOGIC PROPERTIES OF PLAGUE MICROBE CAPSULAR ANTIGEN

M.N. Kireyev, N.P. Gooseva, T.A. Polunina, A.L. Kravtsov, S.A. Bugorkova, N.A. Sharapova,
T.M. Taranenko

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

This study shows that *Yersinia pestis* capsular antigen F1 conjugated to the CS nano-particles demonstrates apparent immunogenic effects. When injected to the test animals it was able to stimulate the production of specific antibodies under smaller antigenic load, it caused activation of the genetic apparatus in the immune system cells, and it stimulated hyperplastic processes in the lymphoid organs. Solutions of CS plus antigens appeared to be stable and caused neither general nor local responses in the test animals; they were easy to make use of, thus demonstrating their potentialities to be exploited as adjuvants in immunologic practices.

Key words: *Yersinia pestis* capsular antigen F1, immunobiological properties, adjuvant

Введение

Сегодня наноматериалы привлекают внимание ученых не только наноразмерами, но и уникальными свойствами. Наночастицы золы золота и серебра используются в биологии и медицине как цитохимические маркеры в электронной микроскопии и иммуноанализе [3, 4, 6, 8, 10]. Имеются данные о применении коллоидного золота в качестве носителя низкомолекулярных веществ для получения антител [EP 0232717, МПК G 01 N 33/531]. Дыкман Л.А. с соавт. [5] успешно использовали конъюгат коллоидного золота как адъювант и растворитель одновременно для биологически активных веществ, таких, как бычий сывороточный альбумин и антиген клеточной стенки бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*.

В идеале адъюванты — это стимулирующие иммуногенез вещества, не обладающие собственным фармакологическим или иным действием на организм. Кроме того, чем меньше доза вводимого антигенного материала, при адекватном иммунном ответе, тем меньше наблюдается побочных эффектов и осложнений [11].

В настоящее время наиболее распространенными адъювантами для вакцин являются препараты на основе масляных эмульсий и суспензий неорганических веществ (адъювант Фрейнда, Al_2O_3), однако они склонны к расслоению фаз, могут вызывать локальные и общие токсические процессы, а также обладают повышенной вязкостью, что затрудняет их введение [1, 11]. Наилучшие результаты в иммунологической практике получены

при использовании липосомальных адъювантов, но они более сложны в изготовлении и требуют значительных материальных затрат. В связи с этим поиск новых адъювантов, позволяющих создавать высокоактивные, нетоксичные и стабильные вакцинные препараты, является весьма актуальным.

Сведений об адъювантных свойствах золы серебра в доступной литературе нами не обнаружено.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния наночастиц коллоидного серебра (КС) на иммунобиологические свойства капсульного антигена чумного микроба и возможности использования его в качестве адъюванта для стимуляции антителообразования.

МЕТОДИКА

В качестве антигена использовали капсульный антиген F1 *Yersinia pestis* вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), выделенного из центрифугата бульонной культуры методом одноэтапной гель-хроматографии на АсА-22 в соответствии с «Инструкцией по изготовлению и контролю капсульного антигена F1 чумного очищенного, сухого» [4]. Препарат F1 представлял собой чистый белок, гомогенный по данным ВЭЖХ, электрофореза и иммунодиффузии [13].

Золь серебра получали путем восстановления из 0,025 % раствора азотнокислого серебра в деионизованной воде при добавлении равного объема 0,05 % раствора боргидрида натрия («Sigma», США)

в деионизованной воде [10]. Золь серебра с размерами частиц в пределах 5 – 12 нм формировался при активном перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 15 минут. «Серебряное число» (минимальное количество белка, защищающее золь против солевой агрегации) оказалось равным 100 мкг на 1 мл золя. В готовый золь (10 мл) добавляли водный раствор антигена F1 (1 мл) с концентрацией 1 мг/мл. Образование серебряного конъюгата F1 проводили при непрерывном перемешивании и комнатной температуре в течение 15 – 20 мин. В готовом растворе концентрация F1 составляла 18 мкг / 0,2 мл (иммунизирующая доза на одну мышшь).

В опыте использовали беспородных белых мышей, массой 18 – 20 г. Исследования выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Министерства Здравоохранения СССР от 12.08.1977 г.

Для изучения воздействия КС как адъюванта использовали четыре группы беспородных белых мышей, по 24 особи в группе (контрольные: интактные и инъецированные стерильным физиологическим 0,14 М раствором NaCl (ФР); иммунизированные: антигеном F1, золем КС, конъюгатом F1 + КС). Мышей иммунизировали однократно, вводя подкожно по 0,2 мл каждого препарата, забор крови декапитацией проводили на 1, 3, 7, 14, 21, 31 и 45 сутки. Кровь собирали в стерильные пробирки для получения сыворотки и в пробирки, обработанные гепарином, для проведения цитофлуориметрических исследований.

В те же сроки для гистологического исследования забирали материал из паховых и забрюшинных лимфоузлов, селезенки, печени, почек, кишечника, легких и сердца. Образцы помещали в 10%-й водный нейтральный раствор формалина, дальнейшую их обработку проводили по общепринятой схеме [12]. Полутонкие парафиновые срезы окрашивали растворами гематоксилина и эозина.

Динамику образования специфических антител в мышинных сыворотках определяли твердофазным иммуноферментным анализом (ТИФА) с использованием антивидового пероксидазного конъюгата.

О функциональном состоянии клеток иммунной системы в цельной крови судили с помощью импульсной цитометрии в потоке на проточном цитофлуориметре типа ICP 22 ФИВЕ (ФРГ), измеряя интенсивность флуоресценции каждой из

находящихся в суспензии клеток, окрашенных акридиновым оранжевым [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как известно, капсульный антиген F1 является основным иммуногеном возбудителя чумы и компонентом химической чумной вакцины [2], поэтому изучение различных способов повышения его иммуногенности актуально и перспективно. Мы использовали наночастицы КС в свободной и конъюгированной с капсульным антигеном форме для изучения стимуляции антителообразования и оценке изменений функционального состояния клеток иммунной системы патогистологическим и цитофлуориметрическим методами.

Результаты этих исследований показали, что F1 *per se*, и конъюгированная с золем серебра, для белых мышей обладает высокой иммуногенной активностью (табл. 1). Специфические АТ в сыворотках начали определяться уже на 7-е сутки, причем при иммунизации одной F1 титр АТ нарастал постепенно, достигая максимума на 14-е сутки, с дальнейшим выходом на более низкий стационарный уровень. Введение мышам конъюгата F1 + КС вызвало резкий подъем образования АТ на 7-е сутки, который оставался на одном уровне до конца наблюдения. В группе контрольных животных и при иммунизации мышей свободным золем серебра иммунологической перестройки не обнаружено.

При патогистологическом исследовании материала от лабораторных животных грубых изменений во внутренних органах и в месте введения препарата, свидетельствующих о резком токсическом действии не обнаружено. В печени и почках регистрировали незначительное полнокровие сосудов и умеренное функциональное напряжение паренхиматозных элементов.

На третьи сутки отмечали умеренное полнокровие сосудов мозгового вещества в регионарных лимфатических узлах. К седьмым суткам в лимфоидных органах регистрировали развитие различной степени выраженности гиперпластических процессов, особенно у животных, иммунизированных препаратами F1 + КС. Так в лимфатических узлах на фоне антигенной стимуляции наблюдали гиперплазию лимфатических фолликулов (В-зоны) и активацию паракортикальных зон (Т-зоны), а в селезенке имела место гиперплазия светлых центров и периартериальных муфт лимфатических фолликулов.

Таблица 1
Изучение адъювантной активности золей серебра при иммунизации белых мышей F1 чумного микроба

№	Группы животных	Доза и способ введения	Титр специфических АТ в ТИФА						
			1-е сут.	3-е сут.	7-е сут.	14-е сут.	21-е сут.	31-е сут.	45-е сут.
1.	Контрольная	ФР 0,2 мл, п/к	–	–	–	–	–	–	–
2.	F1 + ФР	18 мкг F1 в 0,2 мл, п/к	–	–	1:16	1:256	1:128	1:128	1:128
3.	КС	0,2 мл, п/к	–	–	–	–	–	–	–
4.	F1 + КС	18 мкг F1 в 0,2 мл, п/к	–	–	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256

Примечание: в таблице приведены средние титры АТ по каждой группе животных. (–) – специфические АТ не обнаружались.

Способность изучаемых препаратов индуцировать изменения функционального состояния клеток иммунной системы лабораторных животных оценивали методом проточной цитофлуориметрии, измеряя интенсивность зеленой флуоресценции ядерного хроматина лейкоцитов, суправитально окрашенных красителем акридиновым оранжевым. Лейкоциты с активированным генетическим аппаратом, а также пролиферирующие лейкоциты, несущие повышенное содержание ДНК на клетку, идентифицировали на ДНК гистограммах и подсчитывали в процентах как клетки с повышенной интенсивностью ДНК флуоресценции в зеленой области спектра – более 100 условных единиц флуоресценции (каналов). Эти данные, согласно ранее проведенным исследованиям, отражают интенсивность иммунологической перестройки в организме лабораторных животных, иммунизированных препаратами капсульного антигена или капсульными штаммами возбудителя чумы [7].

Установлено, что у контрольных животных, которым вводили стерильный ФР, ядерный хроматин лейкоцитов крови остается в состоянии «покоя». В периферической крови в течение всего периода наблюдения активации генетического аппарата клеток иммунной системы, сопутствующей синтезу в организме специфических антител и других важных для иммуногенеза белковых продуктов метаболизма, не наблюдали также и при введении мышам препарата золь КС, не связанного с F1. Капсульный антиген вызывал достоверные изменения в состоянии ядерного хроматина лейкоцитов крови иммунизированных животных уже через сутки с максимумом клеточного ответа на 3-е сутки иммуногенеза. Интенсивная реакция клеток иммунной системы на препарат F1 + КС развивалась у всех животных с задержкой по времени (на 7-е сутки), что, возможно, отражало адьювантные свойства наночастиц КС и влияло по данным иммуноферментного анализа на динамику образования специфических антител у лабораторных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований иммунологической перестройки в организме лабораторных животных под воздействием различных препаратов КС установлено, что конъюгированные с капсульным антигеном чумного микроба наночастицы КС обладают выраженным иммуногенным действием. Они способны вызывать активацию генетического аппарата клеток иммунной системы, сопутствующую выработке специфических антител, стимулировать

гиперплазию лимфатических фолликулов (В-зоны) и активность паракортикальных зон (Т-зоны). Растворы конъюгатов КС с антигенами стабильны, не вызывают общих и местных реакций, экономичны, удобны в применении, что дает возможность их эффективного использования в иммунологической практике в качестве адьювантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.А., Васильев Н.Н. Адьюванты. – М.: Медицина, 1969. – 205 с.
2. Дальвадянец С.Н., Дубровин М.Ю., Бывалов А.А. Исследование по иммунизации против чумы // Пробл. особо опасных инф. – 2005. – С. 62–67.
3. Дот-иммуноанализ с частицами коллоидного серебра в качестве маркера специфического антигена для исследования сывороток крови людей на бруцеллез / Т.Ю. Загоскина [и др.] // Мед. паразитология и паразитарные болезни. – 2002. – № 2. – С. 15–17.
4. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Применение дот-анализа и иммунозольных маркеров для экспресс-диагностики острых кишечных инфекций // Журн. микробиол. – 1999. – № 4. – С. 93–94.
5. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Староверов С.А., Семенов С.В. Адьювант. Патент RU N 2001133996/13. – 2003.
6. Инструкция по изготовлению и контролю капсульного антигена чумного микроба очищенного сухого. – Саратов. – 1990. – 65 с.
7. Кравцов А.Л. Микрофлуориметрическое исследование в потоке гетерогенных популяций бактерий *Y. pestis* и клеток иммунной системы инфицированных чумой лабораторных животных: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – Саратов, 1997. – 58 с.
8. Обнаружение антигенов бруцелл с помощью частиц коллоидных металлов в качестве маркера специфических антител / Т.Ю. Загоскина [и др.] // Журн. микробиол. – 2001. – № 3. – С. 65–69.
9. Петров Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1983. – 368 с.
10. Полтавченко А.Г., Караваева В.С., Тузилов В.Ф. Использование золей серебра как маркеров иммуноанализа на микротитровальных платах // Журн. микробиол. – 1998. – № 2. – С. 108–111.
11. Ройт А. Основы иммунологии. – М.: Мир, 1991. – 327 с.
12. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: рук-во. – М.: Медицина, 1996. – 543 с.
13. Структурно-функциональные свойства препаратов капсульного антигена Ф1 в процессе хранения / М.Н. Киреев [и др.] // Биотехнология. – 2005. – № 5. – С. 41–43.

Сведения об авторах

Киреев Михаил Николаевич – к.м.н., зав. лабораторией биохимии и протеомики РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; E-mail: rusrap@microbe.ru)
Гусева Наталья Петровна – к.б.н.; с.н.с. РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)
Полунина Татьяна Алексеевна – к.м.н., н.с. РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)
Кравцов Александр Леонидович – д.б.н., в.н.с. РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)
Бугоркова Светлана Александровна – д.м.н., зав. лаб. патоморфологии РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)
Шарапова Наталия Анатольевна – м.н.с. РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)
Тараненко Татьяна Михайловна – д.б.н., в.н.с. РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)