

« М.А. Гендельманнның 110 жылдығына арналған «Сейфуллин окулары – 19» халықаралық ғылыми-практикалық конференциясының материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 19», посвященной 110 - летию М.А. Гендельмана» - 2023.- Т.І, Ч.ІІ.- С.259-262.

УДК 57.083.3:57.084.1

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА, КОНЬЮГИРОВАННЫХ С АНТИГЕНОМ *BRUCELLA* *ABORTUS*

Дыкман Л.А., д.б.н.
Выршиков Р.Д., аспирант
Богатырев В.А., д.б.н.
Староверов С.А., д.б.н.

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов,
ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», г. Саратов, РФ*

Бруцеллез – зоонозная инфекция, вызываемая микроорганизмами рода бруцелл, передающаяся от больных животных человеку, характеризующаяся множественным поражением органов и систем организма [1]. Бактериологическая диагностика бруцеллеза затруднена тем, что рост этих микроорганизмов крайне медленный (до двух месяцев), и посев представляет опасность для лабораторного персонала из-за высокой вирулентности бруцелл. Поэтому наиболее распространены иммунологические тесты (реакции Хаддлсона, Райта, иммуноферментный анализ) [2]. Также затруднены профилактические мероприятия, поскольку массовые профилактические прививки животных не дали ожидаемого результата [3].

Одними из эффективных наноносителей антигенов, предложенными для иммунизации и вакцинации, являются наночастицы золота (НЧЗ). Опубликовано большое количество работ, в которых НЧЗ были использованы для получения антител к целому ряду гаптенов и полноценных антигенов [4]. Были обнаружены адьювантные свойства, присущие самим НЧЗ [5]. В настоящее время с использованием НЧЗ ведутся работы по созданию новых диагностических тестов и вакцин против вирусных, бактериальных, паразитарных инфекций [6].

Цель нашего исследования – изучение возможности применения НЧЗ как иммуномодулятора при иммунизации антигенами, выделенными из *Brucella abortus*.

Для иммунизации животных были синтезированы НЧЗ диаметром 15 нм. НЧЗ получали по методу Френса, используя реакцию восстановления HAuCl_4 цитратом натрия [7]. Восстановление проводили при нагревании 242.5 мл 0.01% водного раствора HAuCl_4 в колбе Эрленмейера на магнитной мешалке с обратным водяным холодильником. После закипания добавляли 7.5 мл 1%-ного водного раствора цитрата натрия. Диаметр синтезированных НЧЗ был определен методами спектроскопии поглощения, трансмиссионной

электронной микроскопии и динамического рассеяния света. Максимум спектра поглощения полученного золя составил $\lambda_{\max}=518.7$ нм, при этом оптическая плотность была $A_{520}=1.15$. Средний диаметр полученных наночастиц составил 15.4 нм. Число частиц в 1 мл при $A_{520}=1$ составляло 1.6×10^{12} . По нашим данным, использование для иммунизации НЧЗ сферической формы со средним диаметром 15 нм является оптимальным [5].

Выделение поверхностных белковых антигенов *B. abortus* проводили с использованием вакцинного штамма бруцелл («Вакцина против бруцеллеза из слабоагглютиногенного штамма *B. abortus* 82 живая сухая»; Щелковский биокомбинат, РФ). Перед выделением антигенов готовили из лиофильно высушенного вакцинного штамма бруцелл ацетоновый порошок. Для получения ацетонового порошка бактериальные клетки заливали ацетоном в соотношении 1:3 и инкубировали на шейкере при 37 С 1.5 ч, осаждали полученную взвесь центрифугированием и удаляли ацетон. Заливку ацетоном, инкубацию, центрифугирование и удаление ацетона повторяли двукратно. Обработанную ацетоном бактериальную массу оставляли при комнатной температуре с доступом воздуха до полного высушивания. Антигенный препараты из ацетонового порошка *B. abortus* получали обработкой бактериальных клеток 10% диметилсульфоксидом (ДМСО). Обработанные ацетоном микробные клетки заливали раствором ДМСО подогретым до 37 С из расчета 1 г бакмассы на 6 мл ДМСО и встряхивали в течение 30-40 мин при 37 С, после чего микробные клетки отделяли центрифугированием (5000 g, 20 мин, 4 С) и диализовали против 0.01 М карбонатно-бикарбонатного буфера (рН 9.6) в течение 2-х суток с пятикратной сменой буфера. После проведения диализа антигены концентрировали с помощью фильтрационной установки Amicon и мембран PLGC, разливали на аликвоты по 300 мкл и лиофильно высушивали. Хроматографическую очистку проводили на колонке 1×5 см с Toyopearl DEAE-650 на хроматографе NGC Quest 10. Носитель уравнивали 0.05 М Трис-НСl, рН 7.5. Уравновешенный образец (100 мкл), содержащий 240 мкг белка, наносили на колонку. Элюаты собирали в виде фракций, используя ступенчатый градиент от 0 до 0.5 М NaCl в H₂O. Значения оптической плотности элюатов контролировали на длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра Spectronic-21.

На следующем этапе проводили конъюгацию выделенных антигенов бруцелл с НЧЗ. Перед конъюгацией определяли «золотое число» (минимальное количество антигена, защищающее золь от солевой агрегации). Для этого в 96-луночном микротитровальном планшете двукратно по 20 мкл титровали водный раствор антигена. В каждую лунку добавляли по 200 мкл 15-нм НЧЗ ($A_{520}=1.0$) и по 20 мкл 1.7 М NaCl и определяли минимальную стабилизирующую концентрацию. При получении конъюгата НЧЗ со антигенами бруцелл «золотое число» составило 25 мг/мл, со стафилококковым белком А – 8 мг/мл. Конъюгацию проводили простым смешением реагентов без использования сшивающих агентов, используя концентрацию антигена на 20% превышающую золотое число.

Полученными конъюгатами проводили иммунизацию белых мышей линии BALB/c массой 18-20 г. Было сформировано 5 групп животных по 6 голов в каждой группе. Препарат вводили внутривентриально двукратно с интервалом в 10 дней, эвтаназию животных проводили через 10 дней после последней инъекции. 1-й (контрольной) группе вводили 0.5 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР); 2-й группе – 0.5 мл НЧЗ ($A_{520}=1.0$); 3-й группе – антиген в дозе 25 мкг; 4-й группе – конъюгат антигена (25 мкг) с НЧЗ; 5-й группе – антиген (25 мкг), эмульгированный 1:1 в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ). После завершения иммунизации собирали сыворотку крови для определения титра и концентрации интерлейкинов, а также проводили выделение перитонеальных макрофагов и клеток селезенки для изучения дыхательной и пролиферативной активности.

Титры полученных по различным схемам антител в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа [8], используя ДМСО-антиген в качестве иммобилизованного антигена, с применением в качестве вторичных антител меченных пероксидазой хрена антитела к IgG мыши. Результаты реакции регистрировали на микропланшетном спектрофотометре Plate Screen. Наиболее высоким оказался титр у мышей, иммунизированных антигеном, эмульгированным в ПАФ – 1:10240. Сам антиген оказался низкоиммуногеным (1:640).

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов проводили по стандартному методу [9]. Спленоциты выделяли по следующей методике [10]: селезенку перетирали в ступке с раствором Хенкса и пропускали через нейлоновый фильтр. Мононуклеарные клетки выделяли на градиенте фиколюверографина, лизировали эритроциты 0.83% хлористым аммонием. Определение дыхательной активности проводили по способности клеток восстанавливать нитротетразоловый синий бромид до формазана по общепринятому методу [11]. Измерение количества восстановленного формазана проводили на спектрофотометре Genesys 10S UV Vis при длине волны 490 нм. В качестве контроля использовали формазан в концентрациях 0.002; 0.02; 0.2 и 2 мг/мл; с этими концентрациями строили калибровочную кривую. При анализе полученных данных можно отметить, что дыхательная активность перитонеальных макрофагов мышей повышается при иммунизации конъюгатом антиген+НЧЗ на 67%, антиген+ПАФ на 80%, нативным антигеном на 35% по сравнению с контрольной группой (контроль – ЗФР).

Для оценки пролиферативной функции лимфоцитов мы использовали антигенную стимуляцию спленоцитов, выделенных от иммунизированных мышей *in vitro*. Данный метод позволяет составить представление о выраженности специфической сенсибилизации организма. При анализе полученных данных можно отметить, что пролиферативная активность мононуклеарных клеток мышей повышается в среднем при иммунизации конъюгатом антиген+НЧЗ в 2.7 раза, антиген+ПАФ в 2.6 раза, нативным антигеном в 1.9 раза по сравнению с контрольной группой.

Специфичность полученных антител анализировали с помощью иммуноблоттинга. После проведения электрофореза образцы белка переносили с помощью полусухого блоттера Ultraphor 2217 на поливинилиденфторидную мембрану «Western S». Мембрану инкубировали в течение 1 ч в поликлональных мышинных антителах, полученных от мышей, иммунизированных конъюгатом антиген+НЧЗ. После чего мембрану промывали и инкубировали с конъюгатом стафилококкового белка А с НЧЗ ($A_{520}=1.0$). Выявлена 1 иммуногенная полоса в районе 35 кДа.

Чувствительность поликлональных антител, полученных от мышей, иммунизированных конъюгатом антиген+НЧЗ, проверяли в дот-иммуноанализе [12]. В качестве образцов на нитроцеллюлозную мембрану в виде серии точек наносили антиген с начальной концентрации 1 мг/мл. Затем блокировали мембрану с нанесенным на нее антигеном в течение 1 ч 2% сухим молоком, разведенным в 0.01 М ЗФР, рН 7.2. После чего мембрану погружали в раствор специфичных антител и проводили инкубацию на шейкере в течение одного часа при комнатной температуре. Затем мембрану трехкратно отмывали от неспецифически связавшихся антител и инкубировали в растворе конъюгата НЧЗ со стафилококковым белком А ($A_{520}=0.5$). Через 5-60 мин, конъюгат связывался с комплексом антиген-антитело, что можно было визуально наблюдать в виде серии красных пятен. Минимально выявляемое количество антигена составило ~ 0.5 пг (двенадцатое разведение).

Определение концентрации интерлейкинов в сыворотке крови проводили с использованием наборов реагентов для ИФА IL-1 β , IL-6 и INF- γ . При анализе полученных данных можно отметить, что наиболее интенсивный рост наблюдался в группе, иммунизированной антиген+ПАФ уровень интерферона в данной группе, составил 272 ± 24 пг/мл. При иммунизации антиген+НЧЗ уровень интерферона составил 211 ± 63 пг/мл. Иммунизация нативным антигеном также показала небольшой рост концентрации интерферона, он составил 116 ± 33 пг/мл. Уровень интерлейкина-бета в группе, иммунизированной антиген+ПАФ, составил 138 ± 21 пг/мл, в группе, иммунизированной антиген+НЧЗ – 160 ± 7 пг/мл, в группе, иммунизированной нативным антигеном – 234 ± 21 пг/мл, соответственно. Уровень интерлейкина-6 в группе, иммунизированной антиген+ПАФ, составил 35 ± 2 пг/мл, в группе, иммунизированной антиген+НЧЗ – 33 ± 4 пг/мл, в группе, иммунизированной нативным антигеном – 24 ± 6 пг/мл, соответственно.

Полученные результаты по иммуногенности комплекса антиген+НЧЗ предполагается в дальнейшем использовать для исследования протективного эффекта конъюгатов НЧЗ с антигенами *B. abortus* при вакцинации животных по сравнению с коммерческой вакциной. Полученные антитела к бруцеллезным антигенам предполагается использовать при разработке тест-систем для диагностики бруцеллеза с применением твердофазных методов иммуноанализа в лабораторных и полевых условиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-14-00077).

Список использованной литературы

1. Pappas G., Brucellosis [Text] / Akritidis N., Bosilkovski M., Tsianos E. // N. Engl. J. Med. -2005. -V. 352. -P. 2325-2336.
2. Al Dahouk S., Nöckler K., Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy [Text] // Expert Rev. Anti Infect. Ther. -2011. -V. 9. -P. 833-845.
3. Ko J., Splitter G.A., Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans [Text] // Clin. Microbiol. Rev. -2003. -V. 16. -P. 65-78.
4. Dykman L.A., Khlebtsov N.G., Immunological properties of gold nanoparticles [Text] // Chem. Sci. -2017. -V. 8. -P. 1719-1735.
5. Dykman L.A., Gold nanoparticles as an adjuvant: Influence of size, shape, and technique of combination with CpG on antibody production [Text] / Staroverov S.A., Fomin A.S., Khanadeev V.A., Khlebtsov B.N., Bogatyrev V.A. // Int. Immunopharmacol. -2018. -V. 54. -P. 163-168.
6. Dykman L.A., Gold nanoparticles for preparation of antibodies and vaccines against infectious diseases [Text] // Expert Rev. Vaccines. -2020. -V. 19. -P. 465-477.
7. Frens G., Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [Text] // Nat. Phys. Sci. -1973. -V. 241. -P. 20-22.
8. Shah K., Maghsoudlou P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): The basics [Text] // Br. J. Hosp. Med. -2016. -V. 77. -P. C98-C101.
9. Leiter, E.H., The NOD mouse: A model for insulin dependent diabetes mellitus [Text] // Curr. Protoc. Immunol. -1997. -V. 24. -P. 15-19.
10. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [Text] // J. Immunol. Meth. -1983. -V. 65. -P. 55-63
11. Bernas T., Dobrucki J.W., The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC [Text] // Arch. Biochem. Biophys. -2000. -V. 380. -P. 108-116.
12. Dykman L.A., Bogatyrev V.A. Colloidal gold in solid-phase assays. A review [Text] // Biochemistry. -1997. -V. 62. -P. 350-356.