

М.Н.Киреев, Т.А.Полунина, Н.П.Гусева, Н.А.Подборонова, Я.М.Краснов,
Т.М.Тараненко

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ АНТИГЕНА Ф1 ЧУМНОГО МИКРОБА, КОНЬЮГИРОВАННОГО С НАНОЧАСТИЦАМИ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА И СЕРЕБРА

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Изучено влияние наночастиц коллоидного золота (КЗ) и серебра (КС) на иммунобиологические свойства антигенов и возможности использования их в качестве адъювантов для стимуляции антителообразования. Показано, что капсульный антиген Ф1 чумного микроба, конъюгированный с наночастицами КЗ и КС, обладает более выраженными иммуногенными свойствами, чем исходный антиген Ф1, независимо от способа введения. Золи золота и серебра с антигенами стабильны, способны стимулировать выработку специфических антител при меньшей антигенной нагрузке, не вызывают общих и местных реакций, удобны в применении, что дает возможность их использования в иммунологической практике в качестве адъювантов при конструировании иммунобиологических препаратов.

Ключевые слова: капсульный антиген Ф1, наночастицы КЗ и КС, адъюванты.

В настоящее время одним из перспективных направлений в области профилактики чумы является создание препаратов нового типа на основе специфических протективных антигенов.

Капсульный антиген Ф1, являясь видоспецифическим антигеном и основным иммуногеном *Yersinia pestis*, играет ведущую роль в развитии противочумного иммунитета и до настоящего времени остается важной составной частью большинства современных чумных вакцинных и диагностических препаратов [3, 10]. В отечественной практике капсульный антиген как вакцинирующий препарат представлен в составе двух экспериментальных химических вакцин: комплекса Ф1 с основным соматическим антигеном (ОСА) гликопротеиновой природы и Ф1, депонированной на геле гидроокиси алюминия [10].

Золи металлов золота и серебра давно используются в иммуноанализе в качестве маркеров специфических антигенов (АГ) и антител (АТ) для диагностики острых кишечных инфекций, бруцеллеза, псевдотуберкулеза и чумы [2, 4, 5, 7, 11, 13]. Имеются сообщения, где коллоидное золото (КЗ) может быть успешно использовано при иммунизации животных как носитель для гаптенных [14], а также в качестве адъюванта и растворителя для таких биологически активных веществ, как бычий сывороточный альбумин и антиген клеточной стенки бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* [1, 13]. Сведений об адъювантных свойствах растворов коллоидного серебра (КС) в литературе нами не обнаружено.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение иммуногенных свойств антигена Ф1 чумного микроба, конъюгированного с наночастицами коллоидного золота и серебра, а также возможности использования зольных этих металлов в качестве адъювантов для стимуляции антителообразования.

Материалы и методы

В качестве антигенов в эксперименте использовали капсульный антиген Ф1, выделенный из центрифугата бульонной культуры вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, методом одноэтапной гель-хроматографии на АсА-22 в соответствии с Инструкцией по изготовлению и контролю капсульного антигена Ф1 чумного очищенного, сухого [6] и бычий сывороточный альбумин (БСА) («Serva», ФРГ).

Препарат Ф1 (сер. 44) представлял собой белок, гомогенный по данным ВЭЖХ и иммунодиффузии [8].

Коллоидное серебро (КС) с диаметром частиц 5–12 нм получали путем восстановления из 0,025 % раствора азотно-кислого серебра в деионизованной воде при добавлении равного объема 0,05 % раствора боргидрида натрия («Sigma», США) в деионизованной воде [11]. Золь серебра формировался при активном перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 15 мин. «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 Ф1 (1 мл) с концентрацией 1 мг/мл. Образование серебряного конъюгата Ф1 проводили при непрерывном перемешивании и комнатной температуре в течение 15–20 мин. В готовом растворе концентрация Ф1 составила 9 мкг / 0,1 мл КС (иммунизирующая доза на одну мышь). Аналогичным образом готовили конъюгат КС с бычьим сывороточным альбумином, исходная концентрация которого составляла 1 мг/мл, а в конъюгате с золем серебра – 90 мкг/мл.

КЗ с диаметром частиц 15 нм получали посредством добавления к 2,5 мл кипящего 1 % водного раствора золотохлористо-водородной кислоты 7,8 мл

1 % раствора цитрата натрия. Раствор кипятили в течение 20 мин при перемешивании [15]. «Золотое число» оказалось равным 7,8 мкг на 1 мл раствора коллоидного золота. Образование золотого конъюгата проводили следующим образом: к 3 мл раствора коллоидного золота добавляли 9 мкл 0,2 М раствора углекислого калия (для создания pH 7,2) и 23 мкл раствора Ф1 (исходная концентрация 1 мг/мл). Смесь тщательно перемешивали и выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре. Конечная концентрация Ф1 в золотом конъюгате составила 7,8 мкг/мл или 1,56 мкг / 0,2 мл. Аналогичным образом готовили конъюгат КЗ с БСА. К 3 мл раствора КЗ добавляли 9 мкл 0,2 М углекислого калия и 30 мкл раствора БСА (исходная концентрация 1 мг/мл). Конечная концентрация БСА в золотом конъюгате составила 10 мкг/мл или 1 мкг / 0,1 мл. Растворы конъюгатов антигенов с КЗ и КС оставались стабильными в течение 2 месяцев (срок наблюдения) в холодильнике при 4 °С.

Иммунизирующие препараты с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ) готовили *ex tempore*, путем смешивания в объемном соотношении 1:1 адьюванта и растворов Ф1 или БСА с исходной концентрацией антигенов 180 и 300 мкг/мл соответственно.

В опытах использовали беспородных белых мышей массой 18–20 г из питомника РосНИПЧИ «Микроб».

Динамику образования специфических антител к БСА и Ф1 в мышинных сыворотках исследовали методом твердофазного иммуоферментного анализа (ТИФА) с использованием антимышиного пероксидазного конъюгата.

Результаты и обсуждение

Для сравнения адьювантных свойств наночастиц коллоидного золота и серебра был выбран стандартный слабый иммуноген – бычий сывороточный альбумин (БСА) [12], в качестве адьюванта сравнения использовали неполный адьювант Фрейнда (НАФ),

Таблица 1

Сравнение адьювантных свойств наночастиц КЗ и КС на примере БСА

Иммунизирующие препараты	Компоненты раствора для иммунизации	Доза БСА и способ введения препарата	Титр специфических антител в ТИФА
БСА + ФР	300 мкг БСА в 1 мл ФР	30 мкг в 0,1 мл, в/м	1:640
БСА + НАФ	1 мл НАФ + 300 мкг БСА в 1 мл ФР	30 мкг в 0,2 мл, п/к	1:2560
БСА + КЗ	10 мкг БСА / 1 мл КЗ	1 мкг в 0,1 мл, в/м	1:160
БСА + КС	90 мкг БСА / 1 мл КС	9 мкг в 0,1 мл, в/м	1:640

Примечания. Здесь и в табл. 2 приведены средние титры антигенов (АТ) по каждой группе животных. ФР – физиологический раствор 0,9 % NaCl; в/м – внутримышечно, п/к – подкожно.

который стимулирует преимущественно гуморальный иммунитет [9].

В опыт было взято 15 беспородных белых мышей: четыре группы по 3 и 3 интактные в качестве отрицательного контроля. Иммунизацию проводили четырехкратно с интервалом в 2 недели по схеме (табл. 1), через 10 дней после последней иммунизации у животных забирали кровь декапитацией.

Из табл. 1 видно, что после 4-кратной иммунизации мышей БСА в дозе 30 мкг титр специфических АТ в контрольной группе (без адьювантов) был в 4 раза меньше, чем в опытной группе, иммунизированной БСА + НАФ. В группах, иммунизированных конъюгатами БСА + КЗ и БСА + КС, титр АТ был в 4 раза ниже и совпадал с контрольной группой, однако иммунизирующая доза БСА была также заметно ниже – в 30 и 3,3 раза соответственно.

Далее мы изучали возможность использования наночастиц КЗ и КС в качестве адьювантов при иммунизации белых мышей капсульным антигеном Ф1 различными способами введения.

В опыт было взято 75 беспородных белых мышей: восемь групп по 9 и 3 – интактные (отрицательный контроль). Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 2 недели, затем, через это же время, однократно реиммунизировали (только АГ), через 10 дней после каждой манипуляции забирали кровь методом декапитации у 3 животных (табл. 2).

В табл. 2 представлена определенная динамика нарастания титра специфических АТ к Ф1 чумного микроба в мышинных сыворотках. Как видно из приведенных данных, АТ появились у всех групп животных уже после первой иммунизации с дальнейшим

Таблица 2

Использование наночастиц КЗ и КС в качестве адьювантов при иммунизации белых мышей Ф1 различными способами

Иммунизирующие препараты	Компоненты р-ра для иммунизации	Доза Ф1 и способ введения	Титр специфических антител в ТИФА		
			1-я иммунизация	2-я иммунизация	3-я иммунизация
Ф1 + ФР	180 мкг Ф1/мл	18 мкг в 0,1 мл, в/б*	1:32	1:320	1:1280
Ф1 + ФР	180 мкг Ф1/мл	18 мкг в 0,1 мл, в/м	1:16	1:320	1:1280
Ф1 + НАФ	1 мл (180 мкг Ф1) + 1 мл НАФ	18 мкг в 0,2 мл, в/б	1:64	1:640	1:5120
Ф1 + НАФ	1 мл (180 мкг Ф1) + 1 мл НАФ	18 мкг в 0,2 мл, п/к	1:64	1:320	1:5120
Ф1 + КЗ	7,8 мкг Ф1/мл КЗ	1,56 мкг в 0,2 мл, в/б	1:64	1:640	1:2560
Ф1 + КЗ	7,8 мкг Ф1/мл КЗ	1,56 мкг в 0,2 мл, в/м	1:64	1:320	1:2560
Ф1 + КС	90 мкг Ф1/мл КС	9 мкг в 0,1 мл, в/б	1:64	1:640	1:5120
Ф1 + КС	90 мкг Ф1/мл КС	9 мкг в 0,1 мл, в/м	1:64	1:320	1:5120

* в/б – внутрибрюшинно.

увеличением их титра при последующих введениях препаратов Ф1.

Необходимо отметить, что после 3-й иммунизации титр АТ в контрольной группе (без адъювантов) был в 4 раза ниже по сравнению с группами, где в качестве адъювантов использовали НАФ и КС. Однако иммунизирующая доза Ф1 с НАФ была одинаковой с контрольной и составляла 18 мкг, тогда как в конъюгате с КС – в 2 раза меньше (9 мкг). Кроме того, титр АТ контрольной группы был в 2 раза ниже по сравнению с группой, иммунизированной препаратом Ф1+КС, причем доза Ф1 была меньше примерно в 11 раз. При анализе результатов в опытной группе видно, что, по сравнению с НАФ, конъюгаты КЗ и КС стимулируют выработку сравнимо высоких титров противочумных антител при меньшей антигенной нагрузке Ф1 в 11 и 2 раза соответственно. Известно, что НАФ является масляной эмульсией и в смеси с антигеном дает расслоение фаз. Это затрудняет его введение и ведет к перерасходу антигена.

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что конъюгаты КЗ и КС с антигенами проявляют более высокие иммуногенные свойства, чем исходные антигены, не обладают вязкостью, стабильны, не вызывают местных и общих реакций, способны стимулировать выработку специфических антител при меньшей антигенной нагрузке и перспективны в иммунологической практике в качестве адъювантов при конструировании иммунобиологических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Староверов С.А., Семенов С.В., изобретатели. Адъювант. Патент RU 2218937. 25 декабря 2003.
2. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Применение дот-анализа и иммунозолотых маркеров для экспресс-диагностики острых кишечных инфекций. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1999; 4:93–4.
3. Дальвадяц С.Н., Дубровин М.Ю., Бывалов А.А., Додонов Н.П., Чичерин Ю.В., Евстигнеев В.И., Пименов Е.В., Еремин С.А., Дятлов И.А., Кутырев В.В. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 3. Ревакцинирующие свойства живой чумной вакцины и препаратов чумных химических вакцин для павианов гамадрилов. Пробл. особо опасных инф. 2005; 89(1):62–7.
4. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И.,

Голубинский Е.П. Использование специфических антител, меченных частицами коллоидного золота, для обнаружения антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализа. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1998; 6:64–8.

5. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И., Голубинский Е.П. Обнаружение антигенов бруцелл с помощью частиц коллоидных металлов в качестве маркеров специфических антител. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 3:65–9.

6. Инструкция по изготовлению и контролю капсульного антигена (Ф1) чумного микроба очищенного сухого. Саратов; 1990. 65 с.

7. Киреев М.Н., Гусева Н.П., Подборонова Н.А. и др. Тест-система для выявления антител к Ф1 чумного микроба у лабораторных животных. В кн.: Матер. VI Межгос. науч.-практ. конф. Волгоград, 2005. С. 246–247.

8. Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Храмченкова Т.А. и др. Структурно-функциональные свойства препаратов капсульного антигена Ф1 в процессе хранения. Биотехнология. 2005; 5:41–3.

9. Медуницин Н.В. Вакцинология. М: Триада-Х; 2004. 448 с.

10. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Саратов; 1992. 172 с.

11. Полтавченко А.Г., Караваева В.С., Тузилов В.Ф. Использование золотых частиц коллоидного золота на микротитровальных планшетах. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1998; 2:108–11.

12. Петров Р.В. Иммунология. М.: Медицина; 1983. 368 с.

13. Староверов С.А., Ермилов Д.Н., Щербаков А.А. и др. Получение антител к антигенам *Yersinia pseudotuberculosis* с использованием в качестве адъюванта частиц коллоидного золота. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2003; 3:54–7.

14. Dykman L.A., Matora L.Yu., Bogatyrev V.A. Use of colloidal gold to obtain antibiotin antibodies. J. Microbiol. Meth. 1996; 24(3):247–8.

15. Frens G. Controlled nucleation for the particle size in monodisperse gold suspensions. Nature Phys. Sci. 1973; 241:20–2.

M.N.Kireev, T.A.Polunina, N.P.Guseva, N.A.Podboronova,
Ya.M.Krasnov, T.M.Taranenko

Studying the Immunogenic Properties of Plague Microbe Capsule Antigen F1 Conjugated with Nanoparticles of Colloid Gold and Silver

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Influence of nanoparticles of colloid gold (CG) and silver (CS) on immunobiological properties of antigens and possibility of their application as adjuvants for antibody formation stimulation were studied. It was shown that F1 capsule antigen of plague microbe conjugated with nanoparticles of CG and CS possesses more strongly expressed immunogenic properties than original F1 antigen independently of the way of injection. Gold and silver sols with antigens are stable, capable to stimulate specific antibody generation subject to less antigen burden, comfortable for use, do not cause general and local reactions. All these facts give the opportunity to use them in immunological practice as adjuvants when engineering immunobiological preparations.

Key words: F1 capsule antigen, CG and CS nanoparticles, adjuvants.

Поступила 14.02.08.