

## ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ

Ляпина А.М.<sup>1,2</sup>, Полянина Т.И.<sup>1</sup>, Ульянова О.В.<sup>1</sup>, Елисеев Ю.Ю.<sup>2</sup>, Телепнев М.В.<sup>3</sup>, Мотин В.Л.<sup>3</sup>, Федорова В.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГНУ Саратовский НИВИ Россельхозакадемии, e-mail: polyanina\_ti@mail.ru

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Минздравсоцразвития России, Саратов, Россия, e-mail: lyapina\_anna@inbox.ru

<sup>3</sup> Университет Техаса, Медицинский Факультет, Галвестон, Техас, США, e-mail: mvtelepn@utmb.edu

На модели инбредных мышей BALB/c показана эффективность применения иммуномодулятора полиоксидония в качестве адъюванта для индукции специфических антител к бактериальным рекомбинантным и химически очищенным антигенам *Yersinia pestis* и *Chlamydia trachomatis* в сравнении с классическими адъювантами – адъювантом Фрейнда и TiterMax. В наших экспериментах полиоксидоний стимулировал выработку достоверно более высоких титров специфических антител к изучаемым антигенам, позволил значительно сократить сроки иммунизации лабораторных животных, легко смешивался с растворами антигенов, не вызывал побочных сайд-эффектов у биомоделей и, таким образом, является перспективным адъювантом для создания высокоэффективных субъединичных вакцин на основе специфических бактериальных антигенов, в том числе против инфекций, вызываемых внутриклеточными бактериями, в частности патогенными иерсиниями и хламидиями.

Ключевые слова: адъюванты, полиоксидоний, бактериальные антигены, гуморальный иммунный ответ, *Yersinia pestis*, *Chlamydia trachomatis*.

## RELEVANCE OF POLYOXIDONIUM FOR ELICITING SPECIFIC ANTIBODIES TO BACTERIAL ANTIGENS

Lyapina A.M.<sup>1,2</sup>, Polyagina T.I.<sup>1</sup>, Ulianova O.V.<sup>1</sup>, Eliseev Yu.Yu.<sup>2</sup>, Telepnev M.V.<sup>3</sup>, Motin V.L.<sup>3</sup>, Feodorova V.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Saratov State Veterinary Institute, Russia, e-mail: polyanina\_ti@mail.ru

<sup>2</sup> Saratov State Medical University, Russia, e-mail: lyapina\_anna@inbox.ru

<sup>3</sup> University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas, USA, e-mail: mvtelepn@utmb.edu

The immunomodulator polyoxidonium was shown to be efficient in eliciting specific antibodies in BALB/c mice to recombinant and purified native antigens of *Yersinia pestis* and *Chlamydia trachomatis* in comparison with the classical adjuvants, such as Freund's complete and TiterMax. In our study polyoxidonium stimulated production of high titers of specific antibodies to these antigens, allowed shorten significantly the immunization time, was easy in handling, harmless for animals, and therefore, it is considered to be the adjuvant of choice for the development of highly efficient subunit vaccines based on specific bacterial antigens, including vaccines against infections caused by intracellular pathogens, such as *Yersinia* and *Chlamydia*.

Key words: adjuvants, polyoxidonium, bacterial antigens, humoral immune response, *Yersinia pestis*, *Chlamydia trachomatis*.

### Введение

Современная вакцинопрофилактика ориентирована на создание субъединичных вакцин на основе рекомбинантных и химически очищенных высокоиммуногенных протективных антигенов. Особо актуальными являются разработки высокоэффективных препаратов специфической профилактики против особо опасных инфекций и социально значимых заболеваний, вызываемых внутриклеточными патогенами. Трудности формирования иммунитета к данной группе заболеваний связаны с особенностями

взаимодействия микроба с клетками организма хозяина, что препятствует образованию адекватного стойкого клеточного и гуморального иммунного ответа.

Для стимуляции иммунного ответа в настоящее время предложена группа адъювантов – неспецифических стимуляторов иммунитета, применение которых в составе субъединичных вакцин позволяет значительно усилить гуморальный и клеточный ответ, а также снизить антигенную нагрузку на макроорганизм. Однако большинство классических адъювантов, демонстрирующих значительное усиление клеточного и гуморального звеньев иммунитета при иммунизации биомоделей, не могут быть использованы для человека ввиду токсичности компонентов, входящих в их состав. Синтезированный российскими учеными препарат полиоксидоний, производное полиэтиленпиперазина [5], демонстрирует хорошие иммуномодулирующие свойства и на протяжении многих лет используется при лечении острых и хронических заболеваний, сопровождающихся снижением иммунитета, таких как сахарный диабет, ожоговая болезнь, детские патологии с иммуносупрессией [1–3; 5]. Важно отметить, что полиоксидоний (ПО) был одобрен и включен в качестве адъюванта в состав противогриппозной вакцины «Гриппол» Российского производства [4; 7].

Таким образом, ПО представляется перспективным кандидатом как иммуномодулятор для создания субъединичных вакцинных препаратов на основе бактериальных антигенов.

**Целью** настоящей работы было изучение способности ПО стимулировать выработку специфических антител к антигенам внутриклеточных патогенов, возбудителей хламидиоза и чумы, в сравнении с другими известными современными иммуностимуляторами – адъювантом Фрейнда (ПАФ) и TiterMax (ТМС).

### **Материалы и методы**

В работе были использованы высокоочищенные рекомбинатные антигены Pla, LcrV и YopM чумного микроба, экспрессированные в *E. coli* [8], а также химически очищенный специфический антиген *Chlamydia trachomatis* гликопептидной природы – С-аг, охарактеризованный ранее [6].

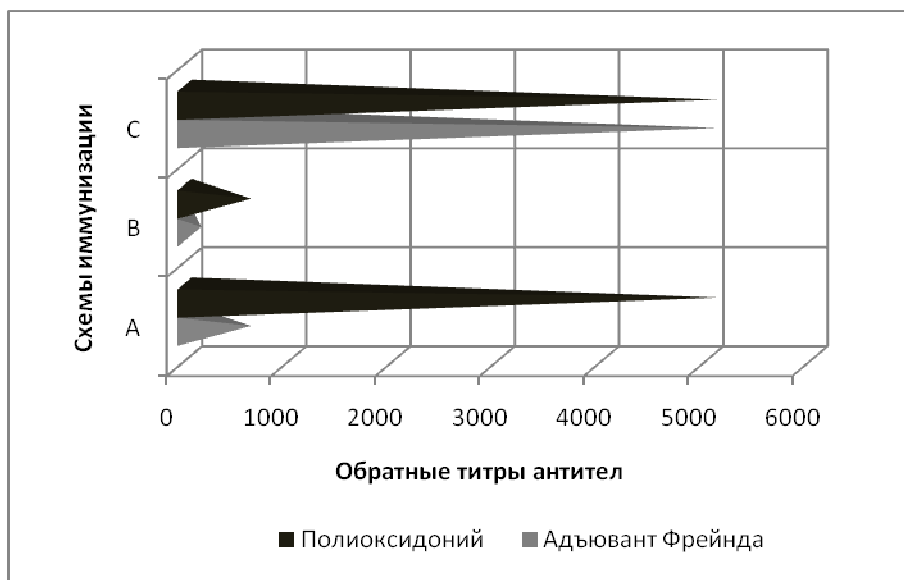
Указанные антигены в концентрациях 5–10 мкг/особь применяли для четырехкратной иммунизации отдельных групп (n=3) мышей BALB/c (ГУ НЦБМТ РАМН, лицензированный питомник филиала «Андреевка», Солнечногорский р-н, п. Андреевка) возрастом 6–8 недель по трем схемам: короткой (А), средней (В) и длинной (С). Каждую группу разделили на подгруппы в зависимости от иммуностимуляторов, использованных при первой иммунизации – ПО (НПО «Петровакс Фарм», Россия), ТМС (Sigma, США) или ПАФ (Sigma, США). Адъюванты смешивали в равных объемах (1:1) с каждым из антигенов и вводили внутривентрально. Все последующие инъекции антигенов проводили без адъювантов, за исключением группы животных, иммунизированных с ПАФ, – данную группу при второй

иммунизации обрабатывали неполным адьювантом Фрейнда (НАФ). Временные интервалы между введением антигенов составляли 3 дня (схема А), 14 дней (схема В) и 21 день (схема С) (Федорова В.А., 2004).

Титры специфических антител в крови иммунизированных животных определяли на четвертый день после последней иммунизации в непрямом твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА). Сенситины в фосфатно-солевом буфере в концентрации 1–10 мкг/мл сорбировали на 96-луночный планшет («Медполимер», Россия). Для проявления реакции использовали конъюгат антимышиных иммуноглобулинов с пероксидазой хрена («Медгамал», Россия). В качестве хромогенного субстрата служил АВТС - 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline sulfonisacid) (Sigma, США), результаты учитывали на ИФА-ридере StatFax 2100 (Awareness Technology, США) при длине волны 405 нм, с использованием отсекающего фильтра на 630 нм. Титр специфических антител определяли как превышающий в 2 раза значение оптической плотности в контрольных лунках ряда.

### **Результаты и обсуждение**

На первом этапе исследования проводили сравнение эффективности использования ПО и ПАФ для стимуляции гуморального иммунного ответа к С-аг у мышей в зависимости от схемы иммунизации. В нашем эксперименте показано, что наибольшие титры антител были получены при иммунизации животных по короткой схеме (А). При этом титры антихламидийных антител в группе мышей, обработанных ПО, в 8–16 раз превышали таковые в группе животных, обработанных С-аг совместно с ПАФ. При использовании средней схемы (В) для иммунизации биомоделей титры анти-С-аг-антител у них были ниже, чем у животных, обработанных по схеме А, однако в группе, обработанной С-аг с ПО, титры антител превышали таковые в группе ПАФ в 4–5 раз. При сравнении результатов, полученных в группе животных, иммунизированных по длинной схеме (С), не было обнаружено значимых отличий в титрах антител, полученных с помощью ПО и ПАФ (рис. 1).



**Рис. 1. Сравнительные титры антител к С-аг у мышей BALB/c, иммунизированных по короткой (А), средней (В) и длинной (С) схемам иммунизации.**

На следующем этапе проводили сравнение титров антител к одному из рекомбинатных антигенов чумного микроба – Plа у животных, иммунизированных по схеме А с использованием трех адьювантов (табл. 1).

**Таблица 1 – Определение в ТИФА титров антител к Plа у BALB/c мышей, иммунизированных с использованием различных адьювантов**

Адьювант	Титры антител в ТИФА
ПО	1:12 800
ТМС	1:6 400 – 1:12 800
ПАФ	1:200 – 1:400

При оценке результатов ТИФА было отмечено, что по сравнению с другими адьювантами применение ПО стимулировало выработку наиболее высоких титров антител при использовании предложенной схемы, на уровне или даже превышающих таковые, полученные с использованием ТМС. При этом различие в титрах анти-Plа-антител в группах, обработанных ПО и ПАФ, составило 32–64 раза.

Еще более значимые титры антител были получены при использовании ПО при иммунизации мышей по схеме А другими антигенами *Y. pestis* – Lcr V и Yop M, которые составили 1:51 200 – 1:102 400 и 1:6 400 – 1:12 800 соответственно.

Сравнимо высокие титры антител в наших экспериментах были получены в группе животных, обработанных ПАФ, только при использовании длинной схемы иммунизации (С) (табл. 2).

**Таблица 2 – Сравнительные титры антител к рекомбинатным антигенам чумного микроба у мышей BALB/c, иммунизированных по схеме С**

Адьювант	Титры антител к рекомбинатным антигенам <i>Y. pestis</i>		
	Pla	LcrV	YopM
ПАФ	1:25 600 – 1: 102 400	1:102 400 – 1:409 600	1:51 200 – 1:409 600

Следует отметить, что использование адьювантов на основе минеральных и синтетических масел (ПАФ, ТМС) было сопряжено с определенными трудностями, более выраженными у адьюванта Фрейнда: плохое смешивание антигена с масляной эмульсией, образование пены при смешивании и в связи с этим потеря некоторого количества антигена, оседающего на стенках инъектора и пробирок для смешивания; образование гранул у биомоделей на месте введения препаратов, а также угнетение общего состояния здоровья лабораторных животных. Применение водорастворимого иммуномодулятора ПО позволяло избежать описанных негативных моментов и побочных эффектов.

Таким образом, в наших экспериментах ПО продемонстрировал высокую эффективность в качестве адьюванта при иммунизации BALB/c мышей рекомбинатными и химически очищенными антигенами бактериальной природы.

### **Выводы**

1. Применение ПО позволяет получить в короткие сроки высокие титры специфических антител, и по этому показателю превосходит классические адьюванты на основе масел – ПАФ и ТМС.
2. ПО легко смешивается с растворами антигенов и не вызывает побочных сайд-эффектов у биомоделей.
3. Перспективным является дальнейшее изучение влияния ПО на изменения иммунного ответа у иммунизируемых биомоделей и определение возможности его использования для создания высокоэффективных субъединичных вакцин против заболеваний, вызываемых внутриклеточными бактериями, в частности патогенными иерсиниями и хламидиями.

### **Список литературы**

1. Иллек Я.И. Эффективность полиоксидония при тяжелом течении пневмонии у детей / Я.И. Иллек, А.В. Галанина, А.Г.Зайцева // Иммунология. – 2003. – № 3. – С. 180-182.
2. Иммуномодулятор «Полиоксидоний» в профилактике и лечении гнойной хирургической инфекции / Р.М. Хаитов, Т.Л. Щельцына, А.А. Бутаков и др. // Хирургия. – 1997. – № 1. – С. 49-54.
3. Клинические и иммуномодулирующие влияния полиоксидония для коррекции вторичного иммунодефицита у больных ишемической болезнью сердца, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа / А.Т. Тепляков, Л.А. Болотская, Т.В. Вдовина и др. // Иммунология. – 2008. – № 1. – С. 44-50.
4. Оценка реактогенности, безвредности и профилактической эффективности тривалентной профилактической полимер-субъединичной вакцины «Гриппол» при введении детям школьного возраста / Г.А. Ельшина, М.А. Горбунов, Т.А. Бектимиров и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2000. – № 2. – С. 50-54.
5. Полиоксидоний – иммуномодулятор последнего поколения: итоги трехлетнего клинического применения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, А.В. Некрасов и др. // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 1999. – № 3. – С. 3-6.
6. Получение препаративного количества мышинных диагностических антихламидийных антител путем направленного иммуногенеза / В.А. Федорова, В.А. Банникова, Ю.Ю. Елисеев и др. // Биотехнология. – 2005. – № 2. – С. 82-90.
7. Эпидемиологическая и экономическая эффективность иммунизации вакциной «Гриппол» при гриппе и ОРВИ у взрослых и детей / Р.В. Хаитов, А.В. Некрасов, Н.Г. Пушкова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2003. – № 3. – С. 83-86.
8. Correlates of immunity elicited by live *Yersinia pestis* vaccine / V.L. Braciale, M. Nash, N. Sinha, I.V. Zudina, V.L. Motin // NIH: Frontiers in Research / ed. V.S. Georgiev. – Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – V. 1. – Ch. 49. – P. 473-480.

### **Рецензенты:**

Назарова Л.С., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», г. Саратов.

Шульдяков А.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Минздравсоцразвития России, г. Саратов.