

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА И ЗОЛОТА, КОНЬЮГИРОВАННЫХ С АНТИГЕНОМ ВИРУСА ТРАНСМИССИВНОГО ГАСТРОЭНТЕРИТА СВИНЕЙ

Меженный П.В.¹, Староверов С.А.^{1,2,3}, Волков А.А.¹, Козлов С.В.¹, Рыбин А.О.¹, Домницкий И.Ю.¹, Ласкавый В.Н.³, Дыкман Л.А.²

¹⁾ Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия, volkov-aleksei@yandex.ru;

²⁾ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия;

³⁾ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН, г. Саратов

Проведено изучение иммуногенных свойств наночастиц селена и золота, конъюгированных с антигеном вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней. При сравнительных иммунобиологических исследованиях было установлено, что иммунизация морских свинок антигеном вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней, конъюгированным как с коллоидным селеном, так и с коллоидным золотом, приводит к активации дыхательной активности лимфоидных клеток и перитонеальных макрофагов, что напрямую связано с повышением трансформирующей активности антителообразующих клеток и активацией выработки антител. Полученные данные позволяют предположить, что коллоидные частицы способствуют презентации антигена органам ретикулоэндотелиальной системы. Кроме того, установлено, что данные носители стимулируют выработку провоспалительных цитокинов, что обуславливает полный и согласованный иммунный ответ как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета.

Ключевые слова: коллоидная частица, коллоидный селен, коллоидное золото, наночастица, наноноситель.

STUDY OF TRANSMISSIBLE-GASTROENTERITIS-VIRUS-ANTIGEN-CONJUGATED IMMUNOGENIC PROPERTIES OF SELENIUM NANOPARTICLES AND GOLD

Mezhenny P. V. ¹, Staroverov S.A. ^{1,2,3}, Volkov A. A. ¹, Kozlov S.V. ¹, Domnitsky I.Y. ¹, Laskavuy V.N. ³, Dykman L.A. ^{2,3}

¹⁾ Saratov State Agrarian University Named After N. I. Vavilov, Saratov, volkov-aleksei@yandex.ru;

²⁾ The Department of the Russian Academy of Science, The Institute for Biochemistry and Physiology of plants and microorganisms, Saratov, Russia;

³⁾ The Department of the Russian Academy for Agricultural Sciences, State Institute Saratov Scientific and Research Veterinary Institute, Saratov, Russia

There was performed the study of the transmissible-gastroenteritis-virus-antigen-conjugated immunogenic properties of selenium nanoparticles and gold. In comparative immunobiological studies there was found that immunization of guinea pigs driven by the colloid-selenium- as well as colloid-gold-conjugated transmissible gastroenteritis virus antigen of swine, leads to activation of the respiratory activity of lymphoid cells and peritoneal macrophages, which is directly related to increased activity of antibody-producing cells and activation of antibody generating. The obtained data suggest that the colloid particles promote antigen presentation to the reticuloendothelial system organs. In addition, there was established that these carriers stimulate production of proinflammatory cytokines, which leads to a complete and consistent immune response of both cellular and humoral components of immune system.

Keywords: colloid particle, colloid selenium, colloid gold, nanoparticle, nanocarrier.

В настоящее время исследовательскими группами уделяется большое внимание синтезу и изучению свойств различных наноматериалов [1; 2]. Бесспорно, наночастицы имеют множество положительных свойств: их можно легко транспортировать, присоединять к их поверхности диагностические и терапевтические вещества, а также иммуноактивные биомолекулы. Эти поистине уникальные свойства наночастиц делают их пригодными как для диагностики, так и для терапевтического применения при лечении различных

заболеваний. Наночастицы обладают пониженной токсичностью и малым временем для высвобождения лекарственного средства в системе кровообращения из-за их специфической и целевой характеристики.

Применение наночастиц золота как носителей антигенов и терапевтических агентов и использование данных конструкций для иммунологических и терапевтических целей уже находят широкое применение в современной медицине и биологии [8]. Особый интерес представляет способность наночастиц золота вызывать гуморальную иммунную реакцию на слабоиммуногенные антигены и гаптены. Имеются данные, свидетельствующие об иммуностимулирующем действии золотых наночастиц, конъюгированных с гастроэнтеритом [3].

В отношении коллоидного селена (КС) в современной литературе встречаются только единичные публикации, которые в основном рассматривают эту структуру как биоактивную добавку. Однако в последние годы получены данные о том, что наночастицы селена можно с успехом использовать в качестве носителя биологически активных молекул [10]. Кроме того, установлено, что, в отличие от коллоидного золота (КЗ), наночастицы селена сами по себе обладают достаточно высокой биологической активностью. Доказано, что соединение селена в наноразмерной форме с гиалуроновой кислотой демонстрирует противоопухолевую активность. Применение КС предотвращает развитие хром-индуцированного тиреотоксикоза у лабораторных животных [9]. Однако об использовании КС в качестве наноплатформы для доставки антигенов к клеткам-мишеням имеются лишь единичные публикации [1].

Цель исследования. Целью настоящего исследования являлось изучение иммуногенных свойств наночастиц селена и золота конъюгированных с антигеном вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней, а также изучение возможности конструирования вакцинных препаратов на основе антигена вируса ТГС с использованием КЗ и КС в качестве наноносителей.

Материал и методы исследования. В настоящей работе в качестве антигена использовали белок капсида вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС), полученный в вирусологической лаборатории Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института РАСХН.

ТГС (лат. -- Gastroenteritisinfectiosasuum) – высоко контагиозное остропротекающее инфекционное заболевание свиней всех возрастных групп, которое характеризуется рвотой, изнурительной диареей, дегидратацией организма, высокой летальностью, особенно среди поросят в первые 10 дней жизни. Данное заболевание, как и прочие вирусные заболевания, наносит большой экономический ущерб свиноводческим хозяйствам [2; 7].

Возбудителем ТГС является РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Coronaviridae*, роду *Alphacoronavirus* группы 1а. Вирион сферической формы диаметром 75-160 нм. Вирусный нуклеокапсид представляет собой гибкую спираль, содержащую однонитевую РНК и большое число молекул нуклеокапсидного белка. Вирус размножается в цитоплазме зрелых эпителиальных клеток, располагающихся на кончиках ворсинок тонкого отдела кишечника.

Для освобождения молекул антигена от ионов металлов проводили диализ водного раствора антигена в ацетатном буфере рН 4,0.

Конъюгацию антигена вируса ТГС с КС проводили по следующей схеме: к 2 мл раствора антигена, с концентрацией общего белка 5 мг/мл, добавляли 250 мкл 1 М раствора солянокислого гидразина и 62,5 мкл 1 М раствора селенита натрия. Доводили общий объем раствора до 5 мл дистиллированной водой. Останавливали реакцию доведением рН раствора до 7,2 1 М раствором гидроксида натрия (100 мкл). Препарат освобождали от низкомолекулярных соединений диализом против фосфатносолевого буфера рН 7,2.

Коллоидное золото (КЗ) со средним диаметром частиц (15 нм) получали, используя реакцию восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Средний размер частиц КЗ контролировали спектрофотометрическим методом.

Получение конъюгата антигена вируса ТГС с КЗ выполняли путем подбора оптимальной концентрации антигена, защищающего золь золота от солевой агрегации.

Для проведения иммунобиологических исследований по принципу аналогов было сформировано 4 группы животных (морских свинок), по 9 голов в каждой. Иммунизацию животных проводили подкожно (вдоль позвоночного столба), двукратно, с интервалом 10 дней.

Первой группе морских свинок вводили раствор антигена вируса ТГС в дозе 1 мл. Второй группе – конъюгат антигена вируса ТГС с КЗ в дозе 1 мл. Третьей группе – конъюгат антигена вируса ТГС с КС в дозе 1 мл. Четвертой группе (контроль) – физиологический раствор в дозе 1 мл.

Эвтаназию морских свинок проводили через 10 дней после последней инъекции. При этом отбирали сыворотку крови для иммунологических исследований. Кроме того, для оценки влияния препаратов на клеточный иммунитет определяли дыхательную активность перитонеальных макрофагов и лимфоцитов селезенки в МТТ-тесте.

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов и клеток селезенки проводили по стандартным методикам. Определение дыхательной активности проводили по способности клеток восстанавливать нитротетразолевый синий бромид до формазана по общепринятому методу (МТТ-тест) [5]. Измерение количества восстановленного формазана

проводили на спектрофотометре Genesys 10SUVVis (ThermoFisherScientific, США) 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.

Для оценки влияния на физиологические параметры организма конъюгатов антигена вируса ТГС с коллоидными частицами золота и селена проводили биохимические исследования сыворотки крови животных. Для оценки функционального состояния печени определяли концентрацию общего белка и его фракций в сыворотке крови морских свинок. Ферментный спектр включал определение активности индикаторных ферментов АСТ и АЛТ. О состоянии функциональной активности почек судили по концентрации мочевины и креатинина в сыворотке крови животных. Биохимические исследования проводили при помощи наборов реагентов Hospitexdiagnostics на биохимическом анализаторе Myndrey (КНР).

Содержание и уход за животными, а также их эвтаназия проводились в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения РФ к работе экспериментально-биологических клиник и «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Определение концентрации интерлейкинов в сыворотке крови проводили при помощи наборов реагентов для иммуноферментного определения интерлейкина-1 бета, интерлейкина-6, интерферона-гамма на иммуноферментном анализаторе PlateScreen (HospitexDiagnostics, Италия).

Результаты исследования и их обсуждение. Изучение эффективности взаимодействия полученных конъюгатов коллоидных частиц с клетками ретикулоэндотелиальной системы исследовали в МТТ-тесте. Обнаружено, что на 10-й день после проведения иммунизации наблюдалось увеличение дыхательной активности клеток макрофагального ряда: при иммунизации антигенов с КС на 66%, а при иммунизации с КЗ на 46% по сравнению с контролем и на 64% и 46% по сравнению с вирусным антигеном соответственно.

При изучении дыхательной активности лимфоидных клеток селезенки были получены схожие результаты. Так, при иммунизации животных конъюгатами антигена с КЗ дыхательная активность клеток селезенки возрастала на 56%, а при использовании конъюгата антигена вируса ТГС с КС - на 78%. Оценивая полученные данные, хочется отметить, что, по-видимому, на данном этапе происходит активизация как антигенпрезентирующих клеток, так и возрастание пролиферативной активности лимфоидных (антителообразующих) клеток селезенки. Данный факт может указывать на то, что коллоидные частицы способствуют презентации антигена органам ретикулоэндотелиальной системы.

В ходе определения концентрации интерферона-гамма (INF- γ) у подопытных животных установлено достоверное повышение его концентрации в группах животных, которым вводили антиген, конъюгированный с коллоидными носителями.

Из полученных данных можно почерпнуть следующую информацию: наибольшая концентрация INF- γ определяется у животных, иммунизированных антигеном, конъюгированным с наночастицами золота и селена, и его концентрация составляет $60,44 \pm 9,91$ и $48,17 \pm 4,43$ пг/мл соответственно.

Полученные данные, указывающие на повышение активности INF- γ , напрямую коррелируют с результатами, свидетельствующими о возрастании дыхательной активности спленоцитов (на 10-й день после последней инъекции), и указывают на способность наночастиц стимулировать выделение интерферона-гамма Т-клетками, тем самым усиливая активность лимфоидного звена иммунитета.

При изучении концентрации интерлейкина-1 бета (IL-1 β) в плазме исследуемых животных нами было установлено, что наибольшее повышение концентрации IL-1 β наблюдалось в группе, иммунизированной антигеном с КЗ, и составила $8,10 \pm 0,74$ пг/мл. В группе, иммунизированной антигеном с КС и просто антигеном, концентрация интерлейкина-1 бета в составила $6,58 \pm 1,06$ и $6,93 \pm 0,91$ пг/мл соответственно. Однако в этих группах также отмечается повышение по сравнению с интактными животными, у которых концентрация интерлейкина-1 бета в крови составила $4,93 \pm 0,71$ пг/мл.

Следует отметить, что повышение активности IL-1 β в группах, иммунизированных как конъюгатом антигеном с коллоидными частицами, так и нативным антигеном, прямо коррелирует с активностью клеток макрофагального ряда и стимулированными В-клетками, которые, активируясь, вырабатывают данный цитокин.

Полученные данные об уровне выработки интерлейкина-6 (IL-6) сопоставимы с данными, полученными при изучении концентрации IL-6 в плазме исследуемых животных, что свидетельствует о стимуляции макрофагов и лимфоцитов. Это коррелирует с активностью клеток макрофагального ряда и стимулированными лимфоидными клетками, которые вырабатывают данный цитокин.

Анализируя титры полученных антител, можно отметить, что при иммунизации животных конъюгатами КЗ обратный логарифм (-lg) титра полученных антител составляет $13,9 \pm 0,4$, а при иммунизации с КС составляет $14,5 \pm 0,4$. Что фактически в два раза превышает титры антител, полученные в контрольной группе (табл. 1).

Таблица 1

Титр противовирусных антител (-lg)

	Антиген вируса ТГС	Конъюгат антиген+КЗ	Конъюгат антиген+КС
Титры антител	12,6±0,2 (1:8192)	13,9±0,4 (1:16384)	14,5±0,4 (1:32768)

Кроме того, в ходе проведения биохимических исследований сыворотки крови исследуемых животных (табл. 2) установлено, что во всех группах животных отклонения от физиологических границ отсутствуют. Это может косвенно свидетельствовать об отсутствии у данных препаратов токсических свойств.

Таблица 2

Биохимические показатели крови животных

Показатель	Ед. изм.	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4 (контроль)
ALT	Е/л	59,1±13,08	46,8±4,32	52,2±14,16	56±1,41
AST	Е/л	117,0±18,49	126,8±28,38	142,8±36,35	168,5±2,12
LDH-L	Е/л	432,9±46,54	570,9±93,07	489,0±77,01	554±8,49
Глюкоза	ммоль/л	7,0±0,42	7,1±0,62	6,3±0,51	5,31±0,06
Белок общ,	г/л	56,2±2,12	54,4±3,84	49,9±2,30	56,6±0,57
Альбумин	г/л	34,1±2,79	33,6±1,93	33,1±1,29	33,35±1,77
Креатинин	ммоль/л	60,8±7,47	57,1±5,97	50,7±2,90	54,55±1,06
Глобулин	г/л	22,1±1,46	20,8±3,27	16,8±1,83	23,25±1,20
AST/ALT		2,0±0,16	2,7±0,60	2,8±0,71	3,02±0,06
А/Г		3,0±4,29	1,7±0,25	2,0±0,23	1,4±0,14
Мочевина	ммоль/л	9,9±1,15	10,9±1,11	8,8±1,30	8,4±0,28

Заключение

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что иммунизация животных антигеном вируса ТГС, конъюгированным как с КС, так и с КЗ, приводит к активации дыхательной активности лимфоидных клеток и перитонеальных макрофагов, что напрямую связано с их трансформирующей активностью и активацией выработки антител. Кроме того, данные носители стимулируют выработку интерферонов и цитокинов, что обуславливает полный и согласованный иммунный ответ как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета на профилактическую иммунизацию. Полученные данные позволяют предположить, что коллоидные частицы, выполняющие роль наноносителей, способствуют усилению экспрессии антигена на поверхности

антигенпрезентирующих клеток и, в свою очередь, обеспечивают эффективную презентацию вирусных пептидов цитотоксическим Т-лимфоцитам и натуральным киллерам.

Выводы

1. Используя коллоидные частицы (селена и золота, выполняющие роль наноразмерного носителя), конъюгированные с антигенами вируса ТГС, была подтверждена возможность создания наномодифицированных вакцин.
2. Было подтверждено иммуногенное действие наночастиц селена и золота, конъюгированных с антигеном вируса ТГС, и установлено, что при введении в организм животного они способны формировать адекватный иммунный ответ организма при минимальных концентрациях вирусного антигена.
3. Иммунизация наночастицами селена и золота, конъюгированными с антигеном вируса ТГС, приводит к активации дыхательной активности лимфоидных клеток и перитонеальных макрофагов, что напрямую связано с их трансформирующей активностью и активацией выработки антител. Также наблюдалась стимуляция выработки цитокинов, что обуславливает полный и согласованный иммунный ответ как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета на профилактическую иммунизацию.

Список сокращений

ТГС – трансмиссивный гастроэнтерит свиней (англ. Transmissible gastroenteritis)

КС – коллоидный селен (CS - colloid selenium)

КЗ – коллоидное золото (CG- colloid gold)

IL-1 β – интерлейкин-1 бета

IL-6 – интерлейкин-6

INF- γ – интерферон-гамма

Список литературы

1. Меженный П.В., Староверов С.А., Волков А.А., Козлов С.В., Ласкавый В.Н., Дыкман Л.А., Исаева А.Ю. Конструирование конъюгатов коллоидного селена и коллоидного золота с белком вируса гриппа и изучение их иммуногенных свойств // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. - 2013. - № 2. - С. 29-32.
2. Смирнова Н.С., Сайфулина В.К., Калюжный И.И., Баринов Н.Д. Профилактика неспецифической бронхопневмонии у свиней на комплексе // Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития : материалы Международной научно-практической конференции / под ред. А.А. Волкова. - 2012. - С. 294-296.

3. Староверов С.А., Видяшева И.В., Габалов К.П., Василенко О.А., Ласкавый В.Н., Дыкман Л.А. Изучение иммуностимулирующего действия золотых наночастиц, конъюгированных с вирусом трансмиссивного гастроэнтерита // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2011. - Т. 151. - С. 418-421.
4. Староверов С.А., Фомин А.С., Волков А.А. и др. Использование фаговых мини-антител для определения концентрации ферритина в сыворотке крови животных // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. - 2012. - № 4. - С. 30-33.
5. Bernas T., Dobrucki J.W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC // Arch. Biochem. Biophys. - 2000. - V. 380. - P. 108-116.
6. Bo Huang, Jinsong Zhang, Jingwu Hou, and Chang Chen Free radical scavenging efficiency of nano-Se in vitro // Free Radical Biology & Medicine. - 2003. - Vol. 35. - No. 7. - P. 805–813.
7. Delmas B., Gelfi J., Laude H. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein // J. Gen. Virol. - 1986. - V. 67. - P. 1405-1418.
8. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // Nature Phys. Sci. – 1973. – V. 241. – P. 20–22.
9. Hassanin K.M., Abd El-Kawi S.H., Hashem K.S. The prospective protective effect of selenium nanoparticles against chromium-induced oxidative and cellular damage in rat thyroid // Int. J. Nanomedicine. - 2013. - V. 8. - P. 1713-1720.
10. Ren Y., Zhao T., Mao G., Zhang M., Li F., Zou Y., Yang L., Wu X. Antitumor activity of hyaluronic acid-selenium nanoparticles in Heps tumor mice models // Int. J. Biol. Macromol. - 2013. - V. 57. - P. 57-62.

Рецензенты:

Калюжный И.И., д.вет.н, профессор кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова», г. Саратов;

Кривенко Д.В., д.вет.н., профессор кафедры «Паразитология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова», г. Саратов.