

Оценка иммуногенных свойств антигенного препарата *Bacillus anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с нанокompозитами

(сообщение 3)

В.И. Дубровина (dubrovina-valya@mail.ru), С.В. Лукьянова, О.В. Юрьева, С.А. Витязева, В.Б. Николаев, К.Ю. Ястремская, С.В. Балахонов (adm@chumin.irkutsk.ru)

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Резюме

В работе представлены материалы исследования на модели морских свинок иммуногенности антигенного препарата, полученного из штамма *Bacillus anthracis* Sterne 34F₂, а также возможность ее усиления с помощью наноструктурированных кобальтарабиногалактана и аргентогалактоманна. Показана способность этих композитов стимулировать неспецифические факторы иммунитета (кислород-зависимые бактерицидные системы фагоцитов). Полученные данные указывают на перспективность дальнейшего исследования сочетанного применения антигенного препарата *B. anthracis* Sterne 34F₂ с кобальтарабиногалактаном и аргентогалактоманном.

Ключевые слова: антигены, нанокompозиты, сибирская язва, фагоциты

Evaluation of the Immunogenic Properties of the Antigen Preparation *Bacillus Anthracis* Sterne 34F₂ Combined with Nanocomposites (Communication 3)

V.I. Dubrovina (dubrovina-valya@mail.ru), S.V. Lukyanova, O.V. Yurieva, S.A. Vityazeva, V.B. Nikolaev, K.Yu. Yastremskaya, S.V. Balakhonov (adm@chumin.irkutsk.ru)

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor, Irkutsk

Abstract

The article presents the research results of the non-specific immune factors of guinea pigs immunized the antigenic preparation strain *Bacillus anthracis* Sterne 34F₂ per se and combined with cobaltarabinogalactan and argentogalactomannan. It is established that antigenic preparation and nanocomposites can stimulate oxygen- and nitric oxygen-dependent bactericidal systems of the experimental animal phagocytes and they can be used to construction of a chemical vaccine against anthrax.

Key words: antigen, nanocomposite, phagocyte, *Bacillus anthracis*

Введение

В последнее время в качестве стимуляторов неспецифической резистентности организма исследователи активно изучают полисахариды растительного происхождения – арабиногалактан и галактоманнан, а также созданные на их основе нанокompозитные комплексы [1 – 3].

Ранее на модели мононуклеарных фагоцитов было показано, что по физико-химическим свойствам, способу применения, доступности и иммуномодулирующим свойствам нанокompозиты могут быть использованы в качестве эффективных компонентов сибиреязвенных вакцин [4 – 7, 9]. Сведения о применении этих препаратов для иммуностимуляции при сибирской язве в доступной литературе отсутствуют.

Цель нашего исследования – сравнительное изучение показателей неспецифической резистентности, возникающей у морских свинок при введении им антигенного препарата штамма

Bacillus anthracis Sterne 34F₂ per se и его же в сочетании с различными металлосодеждающими нанокompозитами.

Материалы и методы

Работа выполнена на модели беспородных морских свинок весом 250 – 300 г (64 животных). В качестве антигенов для иммунизации использовали антигенный препарат *Bacillus anthracis* Sterne 34F₂ S-2 и металлосодеждающие нанокompозиты – кобальтарабиногалактан (Co-АГ) и аргентогалактоманнан (Ag-ГМ). Для достижения сопоставимости групп подопытных животных отбирали случайным образом – по 8 животных в группе. Препараты вводили морским свинкам однократно подкожно во внутреннюю поверхность бедра в 0,5 мл физиологического раствора: группе 1 – антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34 F₂ (25 мкг), группе 2 – S-2 *B. anthracis* Sterne 34 F₂ + Co-АГ (25 мкг + 125 мкг), группе 3 – S-2 *B. anthracis* Sterne 34 F₂ +

Ag-ГМ (25 мкг + 125 мкг). Контролем служили интактные морские свинки. Перитонеальный экссудат (ПЭ) для исследования забирали на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после иммунизации.

Активность кислород-зависимого метаболизма (КЗМ) фагоцитов экспериментальных животных оценивали по показателям НСТ-теста, миелопероксидазы (МПО, КФ 1.11.1.7) и по содержанию неферментных катионных белков (НКБ) [10]. Активность НАДФН-диафоразы (КФ 1.6.99.1) определяли по методу В.Т. Норе, S.R. Vinsent (1989) в собственной модификации [11].

Анализ полученных результатов осуществляли стандартными статистическими методами с использованием пакета программ (Stat Soft, США) Statistica 6 и Microsoft Excel 2003. Результаты работы представлены как индекс стимуляции (ИС) в процентах в виде значений среднего арифметического из выборки (M), при стандартном отклонении (s). Для сравнения средних арифметических использовали U-критерий Манна-Уитни. Результаты считали достоверными, если вероятность ошибки не превышала 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При изучении иммуногенных свойств антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ (S-2) и его же в сочетании с нанокompозитами установлена их способность стимулировать КЗМ фагоцитов морских свинок (рис. 1). В группе экспериментальных животных, которым вводился антигенный препарат S-2, наиболее высокие показатели активности

КЗМ были отмечены на 3-и сутки от момента иммунизации животных.

Проведенные исследования показали, что Со-АГ и Ag-ГМ оказывают иммунокорригирующее действие на активацию КЗМ фагоцитов во все сроки наблюдения, что может указывать на антиоксидантное действие этих нанокompозитов. Тем не менее показатели ИС между группой 2 и 3 только на 7-е, 14-е и 21-е сутки имели статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что антигенные препараты S-2 и S-2 в сочетании с нанокompозитами способствуют повышению активности МПО в фагоцитах во все сроки наблюдения (рис. 2).

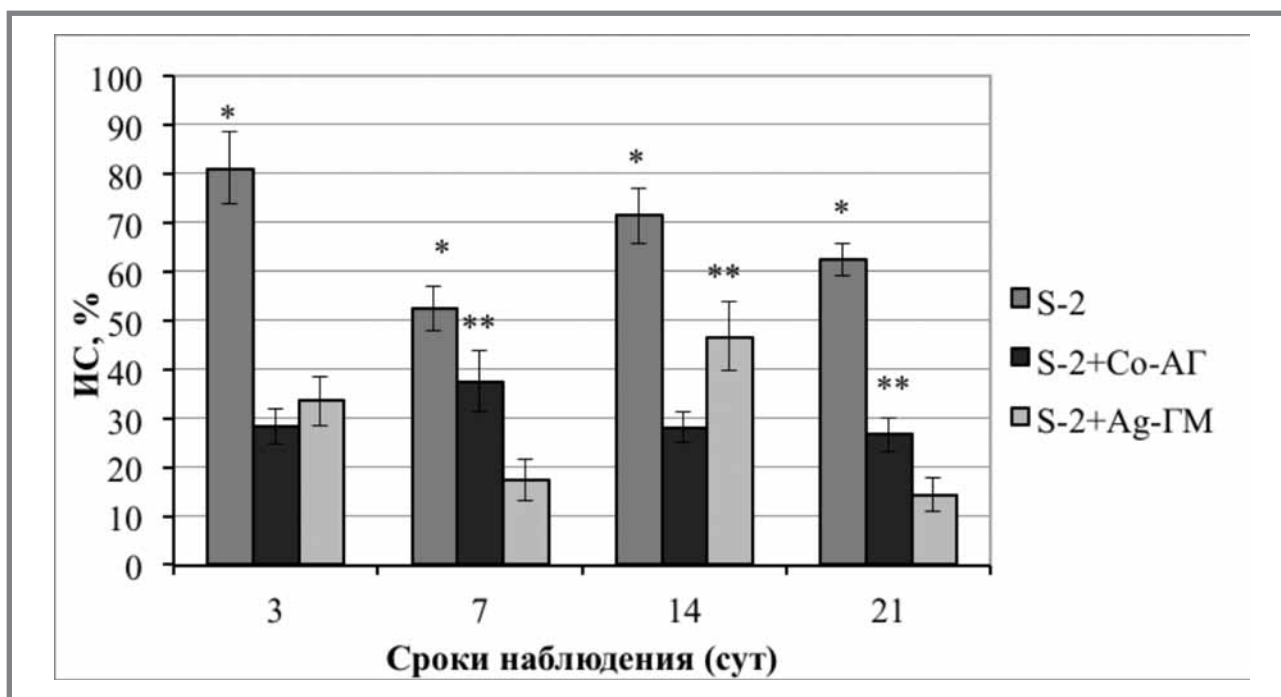
Пик активности фермента выявлен на 14-е сутки после инъекции препаратов.

Однако антигенный препарат S-2 стимулирует КЗМ фагоцитов в большей степени, чем в сочетании с нанокompозитами. Данное обстоятельство может указывать на способность Со-АГ и Ag-ГМ оказывать влияние на образование реактивных форм кислорода.

Известно, что НАДФН-диафoраза является специфическим маркером NO-синтазы и отражает состояние кислород-зависимой микробицидности клеток иммунофагоцитарной системы. Установлено, что антигенный препарат S-2 и его сочетание с Со-АГ или Ag-ГМ стимулируют ($p < 0,05$) активность НАДФН-диафоразы (рис. 3).

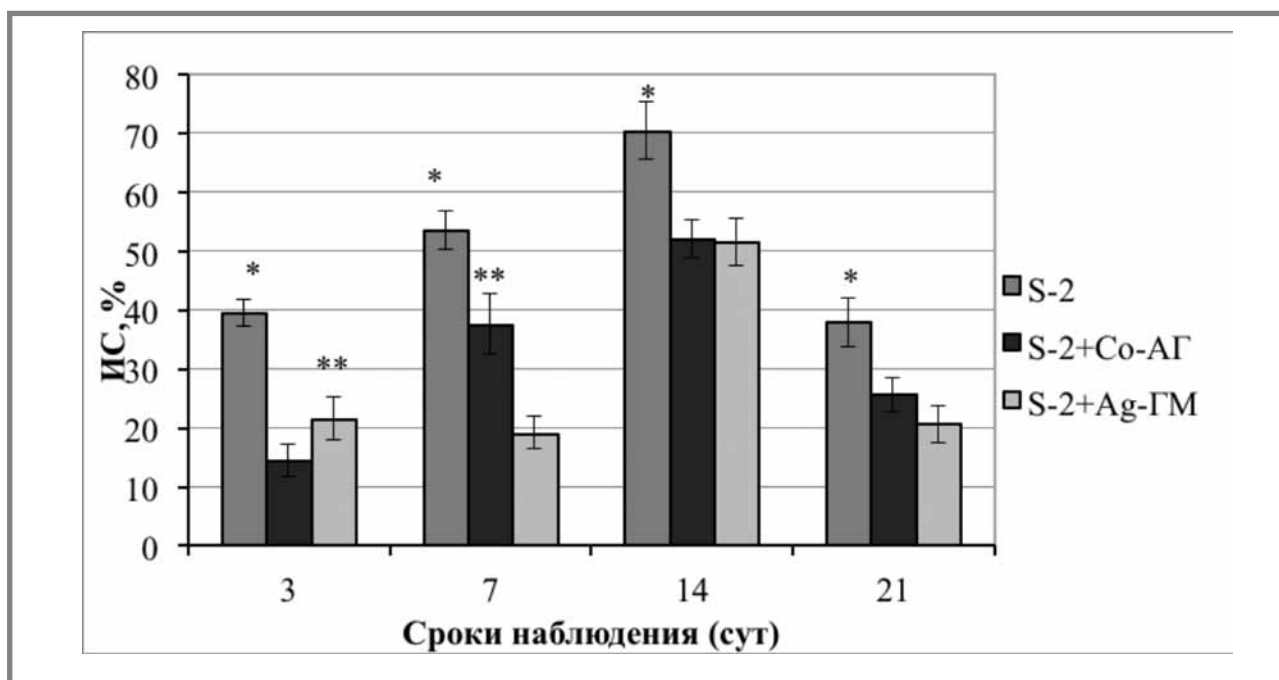
Антигенный препарат S-2 в сочетании с нанокompозитами, как показали исследования, оказывает иммунокорригирующее действие на 7 – 21-е сутки

Рисунок 1.
Влияние экспериментальных препаратов на кислород-зависимый метаболизм фагоцитов морских свинок



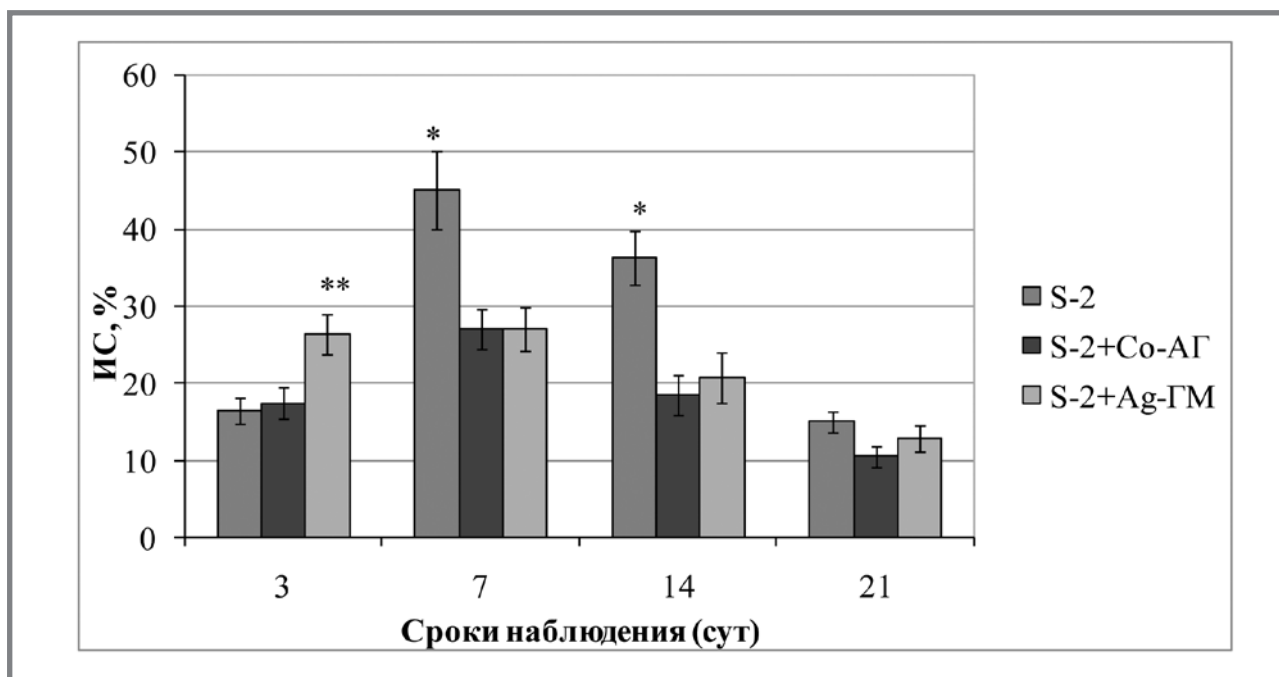
Примечание: *Достоверность различий между группами 1, 2 и 3 ($p < 0,05$); **Достоверность различий между группами 2 и 3 ($p < 0,05$).

Рисунок 2.
Влияние экспериментальных препаратов на активность миелопероксидазы фагоцитов морских свинок



Примечание: *Достоверность различий между группами 1, 2 и 3 ($p < 0,05$); **Достоверность различий между группами 2 и 3 ($p < 0,05$).

Рисунок 3.
Влияние экспериментальных препаратов на активность НАДФН-диафоразы фагоцитов морских свинок



Примечание: *Достоверность различий между группами 1, 2 и 3 ($p < 0,05$); **Достоверность различий между группами 2 и 3 ($p < 0,05$).

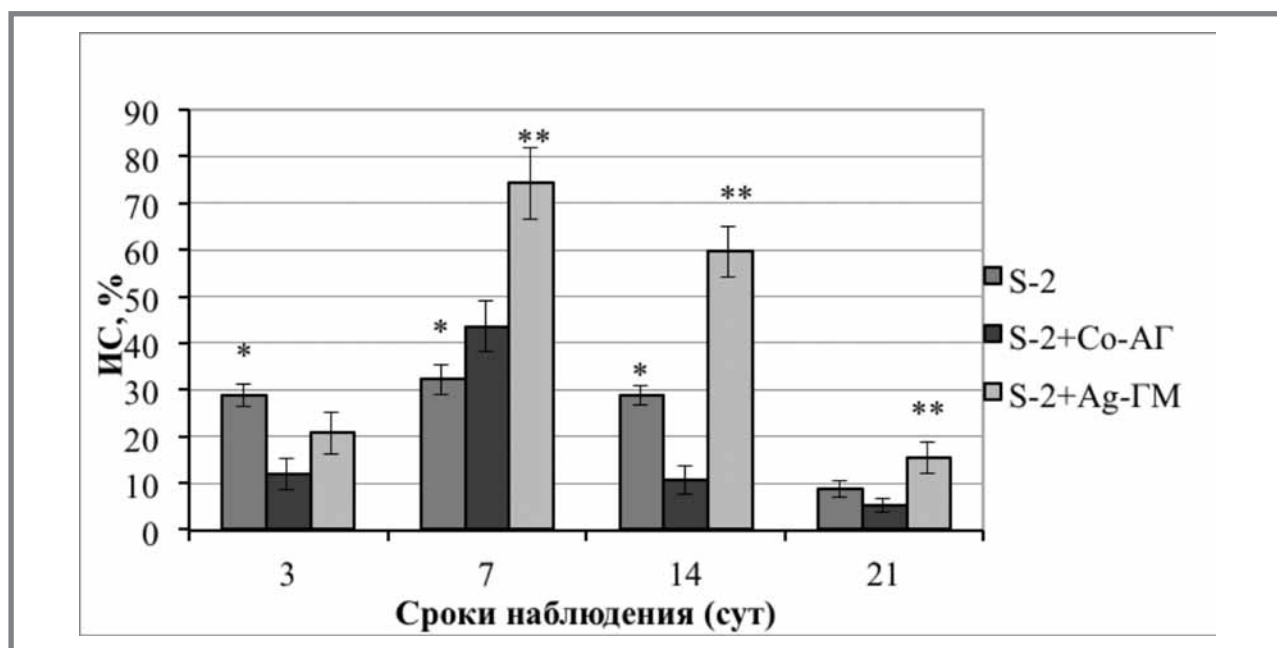
эксперимента. Так, на 7-е и 14-е сутки наблюдения активность НАДФН-диафоразы в фагоцитах животных, иммунизированных антигенным препаратом S-2 в сочетании с Co-AГ и Ag-ГМ, была достоверно ниже, чем в случае применения S-2 ($p < 0,05$). Это свидетельствует о способности исследуемых нанокомпозигов регулировать чрезмерную активность НАДФН-диафоразы фагоцитов, которая может ока-

зывать повреждающее действие на клетки макроорганизма. Достоверные различия между показателями ИС в группе экспериментальных животных 2 и 3 выявлены только на 3-и сутки.

Известно, что неферментные катионные белки фагоцитов обладают бактерицидным действием. Эти протеины также являются медиаторами воспаления, факторами проницаемости, стимуляторами

Рисунок 4.

Влияние экспериментальных препаратов на содержание неферментных катионных белков в фагоцитах морских свинок



Примечание: *Достоверность различий между группами 1, 2 и 3 ($p < 0,05$); **Достоверность различий между группами 2 и 3 ($p < 0,05$).

метаболических процессов и служат источником неспецифических опсоинов при фагоцитозе [12]. В связи с этим следующим этапом наших исследований была оценка действия антигенного препарата S-2 и его в сочетании с Co-AG или Ag-ГМ на содержание неферментных катионных белков в фагоцитах морских свинок (рис. 4).

При иммунизации морских свинок антигенным препаратом S-2 на 3-и сутки выявлено резкое увеличение содержания катионных белков с последующим снижением к 21-м суткам эксперимента. Показано, что в группе животных 2 (S-2 + Co-AG) и 3 (S-2 + Ag-ГМ) на 7-е сутки после иммунизации содержание НКБ в фагоцитах были в 1,9 – 2,7 раза выше, чем в группе 1. На 21-е сутки наблюдения выявлено снижение этого показателя во всех группах.

Таким образом, иммунизация экспериментальных животных антигенным препаратом штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂S-2 в сочетании с нанокompозитами кобальтарабиногалактаном и аргентогалактоманнаном способствует стимуляции бактерицидного потенциала фагоцитов. Вместе с тем показано иммуномодулирующее действие нанокompозитов, которое

проявляется в регуляции активности ферментов кислород-зависимого (МПО, НАДФН-диафороза) и кислород-независимого (НКБ) метаболизма фагоцитов.

Полученные в ходе экспериментов данные указывают на перспективность дальнейшего исследования антигенного препарата штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂S-2 в сочетании с нанокompозитами Co-AG или Ag-ГМ.

Выводы

1. Антигенный препарат штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂S-2 обладает способностью стимулировать активность ферментов кислород-зависимого (МПО, НАДФН-диафороза) и кислород-независимого (НКБ) метаболизма фагоцитов.
2. Кобальтарабиногалактан и аргентогалактоманнан могут регулировать активность кислородзависимых и кислород-независимых бактерицидных систем фагоцитов.
3. Результаты исследования указывают на перспективность дальнейшего исследования сочетанного применения антигенного препарата *B. anthracis* Sterne 34F₂ с нанокompозитами.

Литература

1. Дубровина В.И., Медведева С.А., Витязева С.А., Колесникова О.Б., Александрова Г.П., Гуцол Л.О. и др. Структура и иммуномодулирующее действие арабиногалактана лиственницы сибирской и его металлопроизводных. Аспирант. Иркутск; 2007: 145.
2. Лесничая М.В., Александрова Г.П., Феоктистова Л.П., Сапожников А.Н., Фадеева Т.В., Сухов Б.Г. и др. Серебросодержащие нанокompозиты на основе галактоманна и каррагинана: синтез, строение, антимикробные свойства. Известия Академии наук. Серия химическая. 2010; 12: 1 – 6.
3. Александрова Г.П., Медведева С.А., Грищенко Л.А., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. Способ получения наноразмерных металлических и металлоксидных частиц. Патент РФ. № 2260500 С1 С 08 37/00.
4. Витязева С.А. Закономерности формирования иммунного ответа макроорганизма на введение *Yersinia pestis* EV с иммуномодуляторами: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Иркутск; 2009: 22.
5. Дубровина В.И., Витязева С.А., Коновалова Ж.А., Старовойтова Т.П., Мухтургин Г.Б., Сухов Б.Г. и др. Сравнительная характеристика действия наноструктурированных аргенто-1-винил-1,2,4-триазола, аргентогалактоманна и кобальтарабиногалактана на иммунную реакцию экспериментальных животных. Нанотехнологии и охрана здоровья. 2012; 3 (12): 31 – 38.

6. Дубровина В.И., Войткова В.В., Лукьянова С.В., Юрьева О.В., Николаев В.Б., Александрова Г.П. Результаты исследования действия антигенного препарата *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne в сочетании с кобальтарабиногалактаном на активацию и апоптоз клеток крови *in vitro*. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2014; 4 (77): 78 – 82.
7. Дубровина В.И., Марков Е.Ю., Коновалова Ж.А., Юрьева О.В., Николаев В.Б., Лукьянова С.В. и др. Влияние антигенных препаратов *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne в сочетании с нанокompозитами на иммунный ответ экспериментальных животных. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2014; 3 (76): 92 – 96.
8. Коновалова Ж.А., Дубровина В.И., Витязева С.А., Лукьянова С.В., Войткова В.В., Александрова Г.П. и др. Влияние наноструктурированных аргенто-1-винил-1,2,4-винилтриазола, кобальтарабиногалактана, аргентогалактоманна на антимикробные факторы иммунитета: Матер. Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. 2 т. Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения. Пермь: 2012: 305 – 308.
9. Войткова В.В., Дубровина В.И., Лукьянова С.В., Юрьева О.В., Колесникова О.Б., Кoryтов К.М. и др. Результаты исследования действия антигенного препарата *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne в сочетании с кобальт-арабиногалактаном на субпопуляционный состав В-лимфоцитов (сообщение 2). Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2015; 2 (81): 105 – 110.
10. Дубровина В.И., Коновалова Ж.А., Колесникова О.Б., Татарников С.А., Витязева С.А., Войткова В.В. и др. Определение функционального состояния фагоцитов в качестве показателя неспецифической защиты организма. Методические рекомендации. Иркутск; 2008: 10.
11. Коновалова Ж.А., Дубровина В.И., Балахонов С.В., Старовойтова Т.П., Войткова В.В. и др. Методические рекомендации по определению активности НАДФ-Н-диафоразы в фагоцитах экспериментальных животных. Иркутск; 2011: 12.
12. Плехова Н.Г., Федянина Л.Н., Сомова Л.М., Беседнова Н.Н., Каленик Т.К. Изменение метаболизма фагоцитов крови под влиянием дезоксирибонуклеиновой кислоты из молок лососевых рыб. Тихоокеанский медицинский журнал. 2009; 3:55 – 58.

References

1. Dubrovina V.I., Medvedev S.A., Vityazeva S.A., Kolesnikova O.B., Aleksandrova G.P., Hutsol L.O. et al. The structure and immunomodulatory effects arabinogalactan's of Siberian larch and its metal derivatives. *Irkutsk: Graduate*; 2007: 145 (in Russian).
2. Lesnichaya M.V., Alexandrova G.P., Feoktistova L.P., Sapozhnikov A.N., Fadeeva T.V., Sukhov B.G. et al. The silver-based nanocomposites galactomannan and carrageenan: synthesis, structure, antimicrobial properties *News of Academy of Sciences. Series chemical* 2010; 12: 1 – 6 (in Russian).
3. Aleksandrova G.P., Medvedeva S.A., Grishchenko L.A., Suhov B.G., Trofimov B.A. A method of preparation of nanodimensional metal and metaloxide particles. Patent of the Russian Federation N 2260500 C1 C 08 37/00 (in Russian).
4. Vityazeva S.A. Laws of formation of immunological host response to the introduction of *Yersinia pestis* EV with immunomodulators: *Doktorate of med. sci. diss. Irkutsk*, 2009; 22 (in Russian).
5. Dubrovina V.I., Vityazeva S.A., Konovalova Zh.A., Starovoitova T.P., Muhturgin G.B., Suhov B.G. et al. The comparative characteristics of nanostructured argento-1-vinyl-1,2,4-triazole, argentogalactomannan and cobaltarabinogalactane action on the immune reaction of experimental. *Nanotechnology i ohrana zdorov'ja*. 2012; 3 (12), 31 – 38 (in Russian).
6. Dubrovina V.I., Vojtkova V.V., Lukyanova S.V., Yuryeva O.V., Nikolaev V.B., Aleksandrova G.P. Results of research of action of the antigenic preparation *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne in combination with cobalt-arabinogalactan on activation and apoptosis blood cells *in vitro*. *Epidemiology & Vaccinal Prevention*. 2014; 4 (77): 78 – 82 (in Russian).
7. Dubrovina V.I., Markov E.Yu., Konovalova Zh.A., Yuryeva O.V., Nikolaev V.B., Lukyanova S.V. et al. Influence of *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne antigen preparations in combination with nanocomposites on the immune response of experimental animals. *Epidemiology & Vaccinal Prevention*. 2014; 3 (76): 92 – 96 (in Russian).
8. Konovalova Zh.A., Dubrovina V.I., Vityazeva S.A., Lukyanova S.V., Vojtkova V.V., Aleksandrova G.P. et al. Influence of nanostructured argento-1-vinyl-1,2,4-vinyltriazole, cobaltarabinogalactane, argentogalactomannana on anti-microbial factors of immunity. *Date of All Russian scientific-practical conference of young scientists and specialists of Rospotrebнадzor Federal Service of Surveillance on Consumer' Rights Protection and Human Wellbeing. Perm'*, 2012: 305 – 308 (in Russian).
9. Vojtkova V.V., Dubrovina V.I., Lukyanova S.V., Yureva O.V., Kolesnikova O.B., Korytov K.M. et al. Results of research activities antigenic preparation *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne combined with cobalt-arabinogalactan on subpopulations of B-lymphocytes (Post 2). *Epidemiology & Vaccinal Prevention* 2015; 2 (81): 105 – 110 (in Russian).
10. Dubrovina V.I., Konovalova Z.A., Kolesnikova O.B., Tatarnikov S.A., Vityazeva S.A., Vojtkova V.V. et al. Detection of the functional state of phagocytes as an indication of the body nonspecific defense. *Methodical Guidelines Irkutsk*, 2008: 10 (in Russian).
11. Konovalova Zh.A., Dubrovina V.I., Balakhonov S.V., Starovoitova S.V., Vojtkova V.V. et al. Methodical recommendations for determining the activity of NADPH-diaphorase in phagocytes experimental animals. *Irkutsk*; 2011: 12 (in Russian).
12. Plekhova N.G., Fedyanina L.N., Somova L.M., Besednova N.N., Kalenik T.K. Changing the metabolism of the phagocytes of the blood under the influence of deoxyribonucleic acid from salmon milts fish. *The Pacific medical magazine*. 2009; 3: 55 – 58 (in Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ССД

Интервалы между прививками вакцинами Превенар-13 и Пневмо-23.

Рекомендации Консультативного комитета США по иммунопрофилактике (выдержки)

В США лицензированы две пневмококковые вакцины: 13-валентная конъюгированная (Prevenar 13) и 23-валентная полисахаридная (Pneumovax 23). ACIP рекомендует, чтобы все ранее не привитые взрослые старше 65 лет и лица из группы риска были последовательно привиты Prevenar 13 и Pneumovax 23. Лиц старше 65 лет следует вакцинировать с интервалом 6 – 12 месяцев и более, интервал более 8 недель рекомендован входящим в группу риска (лица с первичным и вторичным иммунодефицитом любой этиологии, в т.ч. ВИЧ-инфицированные, с функциональной и анатомической аспленией, ликвореей, с кохлеарным имплантантом, с хронической почечной недостаточностью, с нефротическим синдромом, с лейкоемией, с лимфомой, с болезнью Ходжкина, с генерализованными злокачественными новообразованиями, с ятрогенной иммуносупрессией, реципиенты солидных органов)

ACIP также рекомендует, чтобы все лица старше 65 лет, привитые Pneumovax 23, через месяца и более после вакцинации были бы иммунизированы Prevenar 13.

Рекомендация о начале проведения курса прививок Prevenar 13 основана на данных, свидетельствующих, что при данной схеме происходит лучший иммунный ответ на антигены обеих вакцин.

Привитым Pneumovax 23 до 65 лет рекомендуется через год и более или по достижении 65-летнего возраста вакцинироваться Prevenar 13.

Одновременное введение обеих вакцин не допускается.

Рекомендации завершены таблицей, в которой приведены интервалы между прививками, рекомендуемые для возрастных групп 24 – 72 месяца, 6 – 18 лет, 19 – 64 года и более 65 лет, а также для лиц, входящих в группу риска.

К рекомендациям прилагается библиография (18 ссылок).

Источник: <http://www.cdc.gov/mmvr/pdf/wk/mm6434.pdf>

Подготовил : Н.А. Озерецковский