

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРОБНЫХ АНТИГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МИЦЕЛЛЯРНЫМ НОСИТЕЛЕМ, С ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ

Сынкин С.Ю.¹, Ермилов Д.Н.¹, Пристенский Д.В.², Староверов С.А.²,
Щеголев С.Ю.², Дыкман Л.А.²

¹ ЗАО «Нита-Фарм», г. Саратов

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

410049 Россия, Саратов, просп. Энтузиастов, 13

Тел: (8452)97-03-83, 97-04-44

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении последних лет в литературе встречается все больше информации о применении носителей нанометровых размеров в качестве средств доставки антигенов и лекарственных веществ к иммунокомпетентным клеткам организма [1, 2]. С помощью таких систем можно значительно снизить токсичность и повысить эффективность действия традиционно используемых лекарственных препаратов [3, 4]. Наиболее перспективно применение наночастиц в качестве составных частей потенциальных лекарственных форм для конструирования противоопухолевых, противогрибковых, бактерицидных и противовирусных препаратов [4]. Кроме того, в последнее время большое внимание уделяется разработке вакцинных препаратов на основе нанометровых носителей и их применению в медицине и ветеринарии [5, 6].

Однако многие вопросы конструирования, изучения и использования комплексов «активное вещество - корпускулярный носитель» остаются открытыми. В частности, это касается вопросов связанных с комплексами, сконструированными на основе неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ) и с фармакодинамикой этих структур. Поэтому мы поставили перед собой задачу исследовать взаимодействие бактериальных антигенов, ассоциированных с ПАВ, с клетками ретикуло-эндотелиальной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антигены для исследования выделялись из полевого штамма *Salmonella thyphimurium*, любезно предоставленного нам сотрудниками кафедры микробиологии Саратовского государственного аграрного университета имени Н.И. Вавилова.

Выделение антигена осуществляли по следующей методике: микробную массу наращивали на среде 2xTYE или мясопептонном бульоне (10г/л триптона, 5г/л дрожжевого экстракта, 5г/л хлорида натрия; 10г/л мясного экстракта, 10г/л пептона) в течение 24 часов при 37°C при перемешивании на термостатируемом шейкере. Культуру собирали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин. Ресуспендировали биомассу в 0.25 N трихлоруксусной кислоте (ТХУ) в объемном соотношении 1:100. Суспензию оставляли на леднике в течение 30-45 мин. Центрифугировали при 8000-10000 об/мин 30-45 мин. Образовавшийся небольшой осадок щелочноземельных солей отбрасывали, использовали слегка желтоватый опалесцирующий супернатант. Очистку экстракта осуществляли путем диализа через коллоидную мембрану. Диализ проводили против проточной воды в течение суток. Полученную жидкость нейтрализовали добавлением Na_2CO_3 с применением фенолового красного как индикатора. Антиген из диализованного раствора осаждали спиртом или ацетоном.

После выделения антигенов проводили их изучение методом электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле по общепринятой методике [7]. Количественное определение белка проводили по методу Лоури, полисахаридов – фенольно-сернокислотным методом. Конъюгирование антигена с флюоресцеинизоцианатом (ФИТЦ) проводили по общепринятой методике [8].

В качестве неионогенного ПАВ мы использовали Твин 80. ПАВ также конъюгировали с ФИТЦ [8]. После конъюгирования антиген и ПАВ смешивали по следующей методике:

Дата поступления: 13.10.2006.

1). *Приготовление липофильной фазы:* один грамм Твина 80 перемешивали в 1 литре дистиллированной воды при 37°C до образования гомогенного раствора. Конечная концентрация Твин 80 в нашей системе составляла 1 мг/мл. Согласно сертификату качества для данного препарата (фирма BASF), критическая концентрация мицеллообразования для этого ПАВ составляет 0.2 мг/мл, что согласуется с результатами наших оценок по сдвигу максимума поглощения света Кумасси R-250 в присутствии и отсутствии мицелл [9].

2). *Приготовление гидрофильной фазы:* антиген растворяли в дистиллированной воде до концентрации 27 мкг/мл.

3). *Приготовление препарата:* к 10 мл подогретой до 37°C липофильной фазы приливали 10 мл подогретой до 37°C гидрофильной фазы, растворы перемешивали.

Перитонеальные клетки крыс получали по общепринятой методике [8]. Лейкоциты анализировали на гемоанализаторе «Аркус» (Австрия). Получили следующие данные: общее количество клеток $7.0 \cdot 10^9$ л, из них лимфоциты – 60% , моноциты – 2.6%, нейтрофилы – 37.4%.

Далее клеточную суспензию разводили до конечной концентрации $1.0 \cdot 10^9$ и разливали в стерильные пробирки по 100 мкл. К полученной суспензии добавляли исследуемый препарат в количествах, приведенных в табл. 1.

Таблица 1

Схема смешивания клеток с исследуемыми образцами

№ пробы	Объем суспензии клеток, мкл	Объем и наименование компонентов
1	100	1% Твин 80 - ФИТЦ 100мкл
2	100	Антиген 100 мкл
3	100	Твин / антиген 1:1 100 мкл
4	100	Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) рН 7.4 100

		МКЛ
--	--	-----

Затем пробирки инкубировали в термостате в течение 3 часов при 37°C. После инкубации из данных проб готовили мазки, фиксировали их 10 минут парами 4% формалина и микроскопировали на люминесцентном микроскопе (LEICA, Германия) при 600- и 1500-кратном увеличении.

Оценку фагоцитарной активности клеток проводили по способности клеток восстанавливать нитротетразоловый синий до формазана по общепринятому методу [10]. Измерение количества восстановленного формазана проводили на микропланшетном спектрофотометре Power Wave (Bio-Tek Instruments, INC.) при длине волны 490 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В работе использовали антигенный комплекс, выделенный из *S. typhimurium* посредством экстракции биомассы ТХУ. После выделения антиген содержал 27.683 мкг/мл белка и 202.06 мкг/мл полисахаридов. При проведении электрофореза наблюдалась белоксодержащая доминанта с молекулярной массой примерно 5-7 кДа (рис 1). Полученный белковый антиген был конъюгирован с ФИТЦ и в дальнейшем использовался в наших исследованиях.

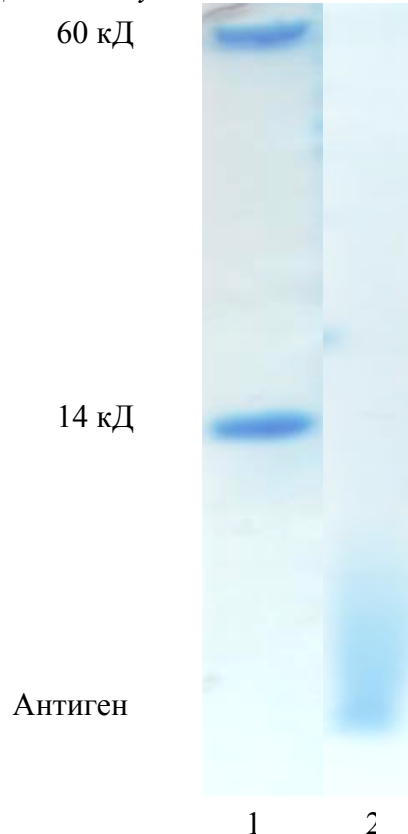


Рис. 1. Электрофореограмма антигенов выделенных из *S. thyphimurium*: дорожка 1 – стандарты, 2 – образец

При инкубировании клеток в присутствии антигена, заключенного в мицеллы, мы зафиксировали его внутриклеточное проникновение (рис. 2). Однако, получив данный результат, мы не ответили на вопрос, проникает ли сам мицеллярный носитель в клетку. Поэтому мы провели конъюгирование Твина 80, входящего в состав мицеллярного носителя, с флуоресцирующим красителем и внесли полученный нами конъюгат в культуру перитонеальных макрофагов.

На рис. 3 показаны клетки, культивируемые в присутствии Твина 80, меченного ФИТЦ. По-видимому, Твин, проходя через клеточную стенку, попадает в цитоплазму клетки (на это указывает зеленое свечение на оболочке клетки и в ее цитоплазме). Ядра клеток окрашены желтым цветом. Красным светится ядро мертвой клетки.

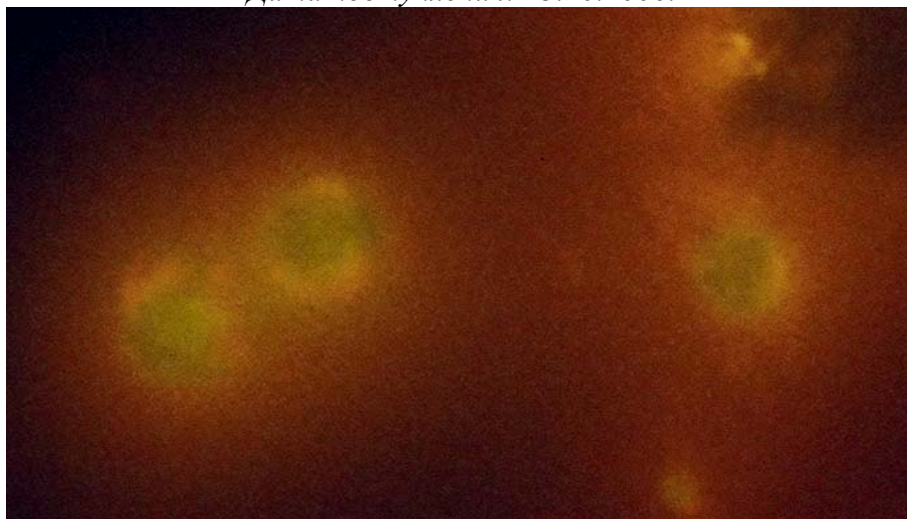


Рис. 2 Перитонеальные клетки крыс, культивированные с антигеном, заключенным в мицеллы (антиген – зеленое свечение)

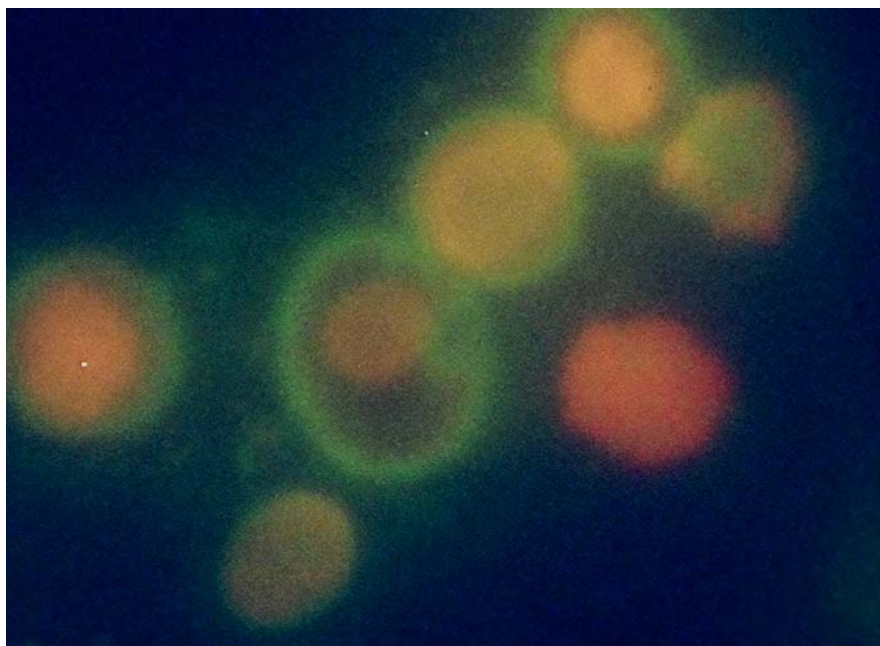


Рис. 3 Перитонеальные клетки крыс, культивированные с мицеллами, мечеными ФИТЦ (зеленое свечение)

Установив способность антигена проникать внутрь перитонеальных клеток, а также способность мицеллярного носителя стимулировать это проникновение, мы предположили, что данная коллоидная система может стимулировать бактерицидную способность клеток лейкоцитарного ряда. Поэтому нами было исследовано влияние

антигенов и корпускулярных носителей на фагоцитарную активность перитонеальных клеток крыс (рис. 4).

Исследование фагоцитарной активности проводили с использованием солей тетразолия, которые применяются для характеристики функционального состояния клеток при фагоцитозе. Это основывается на теории кислородного взрыва. По количеству восстановленного формазана судят о степени активации клеток этого типа. Хотя кислородный взрыв может и не быть основным механизмом лизиса поглощенных фагоцитами клеток, была получена положительная корреляция между количеством формазана и цитотоксической активностью в культуре полиморфноядерных нейтрофилов человека [11].

Из рис. 4 видно, что внесение ПАВ в клеточную культуру приводит к увеличению восстановленного формазана в клетках до 0,175 мкг; внесение смеси ПАВ-антиген приводит к еще большему усилению выработки формазана (0,222 мкг), что указывает на совместное действия антигена и ПАВ на клетки.

Анализируя полученные данные, следует отметить, что, по-видимому, сам ПАВ воздействуя на систему мембран клеток повышает их бактерицидную активность за счет стимуляции клеточного дыхания.

В заключение можно предположить, что ПАВ за счет проникновения во внутреннее пространство перитонеальных клеток способен вызывать стимуляцию их фагоцитарной активности. Это может в дальнейшем способствовать повышению их иммунопрезентирующих свойств.

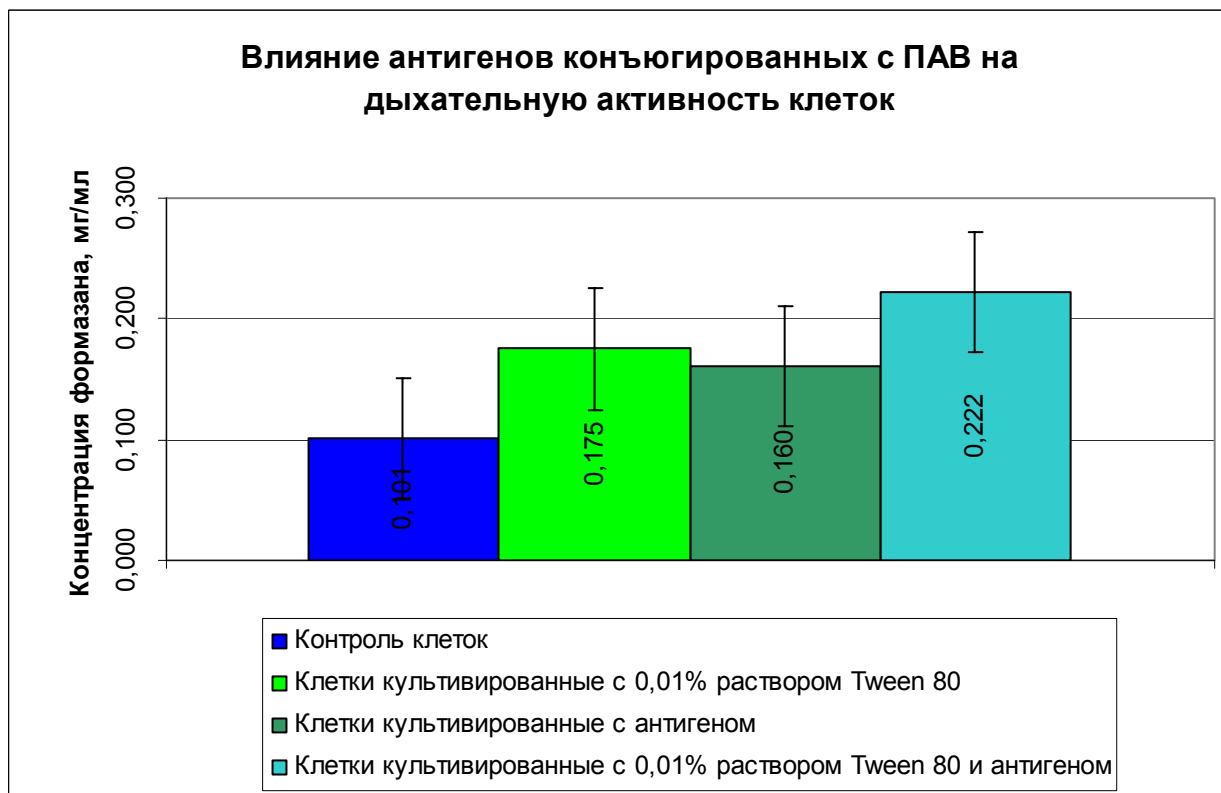


Рис. 4 Изменение концентрации восстановленного формазана в клетках при использовании антигена заключенного в ПАВ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 04-04-48224.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Speiser P.P. Nanoparticles and liposomes: A state of the art // Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol. 1991. V. 13. P. 337-342.
2. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics // Nat. Rev. Drug Discov. 2003. V. 2. P. 347-360.
3. Comoglu T., Conul N. Microemulsions // J. Fac. Pharm. Ankara. 1997. V. 26. P. 95-108.
4. Kwon G.S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds // Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 2003. V. 20. P. 357-403.

5. Morein B., Hu K.-F., Abusugra I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004. V. 56. P. 1367-1382.
6. O'Hagan D.T. Recent developments in vaccine delivery systems // *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2001. V. 1. P. 273-286.
7. Лефковитс И., Пернис Б. Методы исследований в иммунологии. - М.: «Мир». 1981. 486 с.
8. Фримель Г. Иммунологические методы. - М.: «Медицина». 1987. 472 с.
9. Kleinschmidt J.H., Tamm L.K. Structural transitions in short-chain lipid assemblies studied by ³¹P-NMR spectroscopy // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 994-1003.
10. 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.
11. Oez S., Platzer E., Welte K. A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes // *Blood.* 1990. V. 60. P. 97-102.